

Isolierung und quantitative Bestimmung von Adrenalin,  
Noradrenalin, Dopamin und ihren basischen Metaboliten  
aus postmortalem Urin

Josef Mößmer

Diss.  
München  
1906



Digitized by the Internet Archive  
in 2026





Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Spann

---

Isolierung und quantitative Bestimmung von Adrenalin,  
Noradrenalin, Dopamin und ihren basischen Metaboliten  
aus postmortalem Urin

Inaugural Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Josef Mößmer  
aus Hauzenberg

München, 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Spann  
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. G. Kauert  
Dekan: Prof. Dr. W. Spann  
Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.1986

## Inhaltsverzeichnis

|         |                                                         |    |
|---------|---------------------------------------------------------|----|
| 1.1     | Die Stressreaktion im menschlichen Organismus           | 1  |
| 1.2     | Die Agonie als extremer Stressreiz                      | 3  |
| 1.3     | Die Feststellung von Todesursachen                      | 4  |
| 1.4     | Zur Anatomie der Nebenniere                             | 8  |
| 1.5     | Steuerung der KA-Sekretion                              | 9  |
| 2.      | Biosynthese und Metabolismus der Katecholamine          | 10 |
| 2.1     | Biosynthese                                             | 10 |
| 2.2     | Metabolismus                                            | 10 |
| 2.2.1   | MAO                                                     | 11 |
| 2.2.2   | COMT                                                    | 13 |
| 2.2.2.1 | Lokalisation im Gewebe                                  | 13 |
| 2.2.2.2 | Biochemische Funktion                                   | 13 |
| 2.2.2.3 | Die physiologische Rolle der COMT                       | 16 |
| 2.2.3   | Die extraneurale Aufnahme                               | 20 |
| 2.2.3.1 | Die physiologische Rolle der extraneuralen Aufnahme     | 22 |
| 2.2.4   | Die Regelung der Nebennierenmarkenzyme bei Stress       | 24 |
| 2.2.5   | KA-Metabolismus unter Stress                            | 25 |
| 2.2.6   | Katecholamine im menschlichen Urin                      | 27 |
| 2.2.7   | Änderung der Urinausscheidung bei Stress                | 36 |
| 2.2.8   | Änderung der KA-Exkretion bei verschiedenen Krankheiten | 38 |
| 2.2.9   | Der Exkretionsmechanismus in der Niere                  | 40 |
| 3.      | Problemstellung                                         | 42 |
| 4.      | Eigene Untersuchungen                                   | 44 |
| 4.1     | Materialien und Reagenzien                              | 44 |
| 4.1.1   | Geräte                                                  | 44 |
| 4.1.2   | Substanzen                                              | 45 |
| 4.1.3   | Reagenzien                                              | 45 |
| 4.2     | Hydrolyse                                               | 45 |
| 4.3     | Derivatisierung                                         | 46 |

|      |                                    |    |
|------|------------------------------------|----|
| 4.4  | Lösungsmittlextraktion             | 47 |
| 4.5  | Gelchromatographie                 | 48 |
| 4.6  | Ionenaustauschchromatographie      | 51 |
| 4.7  | Umrechnung der Salze               | 58 |
| 4.8  | Wiederfindungsrate                 | 58 |
| 4.9  | Reproduzierbarkeit                 | 58 |
| 4.10 | Erstellen einer Eichgerade         | 60 |
| 4.11 | Leerwert                           | 63 |
| 4.12 | Untersuchung von postmortalem Urin | 64 |
| 4.13 | Betrachtung der Ergebnisse         | 66 |
| 4.14 | Diskussion                         | 70 |
| 4.15 | Zusammenfassung                    | 76 |

|               |                      |
|---------------|----------------------|
| <u>Anhang</u> | Literaturverzeichnis |
|               | Lebenslauf           |

## Verwendete Abkürzungen

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| A     | Adrenalin                           |
| ACTH  | Adrenocorticotropes Hormon          |
| ADH   | Antidiuretisches Hormon             |
| COMT  | Catechol-O-methyltransferase        |
| CRF   | Cortikotropin releasing factor      |
| DA    | Dopamin                             |
| DBH   | Dopamin- $\beta$ -hydroxylase       |
| DDC   | Dopa-decarboxylase                  |
| Dopa  | Dihydroxy-phenylalanin              |
| DOPEG | Dihydroxyphenylglykol               |
| GC    | Gaschromatograph                    |
| HVS   | Homovanillinsäure                   |
| KA    | Katecholamin                        |
| MN    | Metanephrin                         |
| MAO   | Monoaminoxydase                     |
| MoT   | 3-Methoxytyramin                    |
| MOPEG | 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykol     |
| NA    | Noradrenalin                        |
| NMN   | Normetanephrin                      |
| NN    | Nebenniere                          |
| NNM   | Nebennierenmark                     |
| NNR   | Nebennierenrinde                    |
| PNMT  | Phenyläthylamin-N-methyltransferase |
| PSA   | Propionsäureanhydrid                |
| TH    | Tyrosinhydroxylase                  |
| Tyr   | Tyramin                             |
| VMS   | Vanillinmandelsäure                 |
| ZNS   | Zentralnervensystem                 |



## 1.1 Die Stressreaktion im menschlichen Organismus

Die Stressreaktion im Organismus beinhaltet Verhaltensweisen, Kreislaufänderungen und biochemische Vorgänge.

Stress ist eine phylogenetisch erworbene Antwort des Organismus auf Ursachen, welche direkt und symbolisch seine Unversehrtheit gefährden.

Der Reiz, der Stress hervorruft, ist ein Stressor.

Um ein Stressor zu sein, muß ein Reiz entweder quantitativ exzessiv oder qualitativ stressend sein. Physiologische Reize, die normale Grenzen überschreiten (z. B. Arbeit oder Absinken des Blutzuckerspiegels), können zum Stressor werden.

Ein qualitativer Stressor ist unphysiologisch, unüblich und tatsächlich oder gelegentlich schädlich. In einem bestimmten Ausmaß kann die Stressantwort, vom Zustand des Individuums und seinen Erfahrungen bestimmt, verändert werden. Wiederholte Stressreize ohne ungünstige Auswirkung schwächen die Stressantwort. Ungünstige Erfahrungen mit einem Stressor verstärken die Stressreaktion.

Im Hinblick auf den Stressreiz kann ein physischer und ein psychischer Stresstyp unterschieden werden. Wobei zu beachten ist, daß die Mehrzahl der physischen Stresstypen auch eine psychische Komponente haben.

Stress befähigt den Organismus zu erhöhter Leistung. Zuvorderst besteht die Stressantwort in der Bereitstellung von Energiereserven.

Olfaktorische, optische, akustische, taktile oder interoceptive Reize können als Stressor fungieren. Das Signal kommt über nervöse oder humorale Wege (z. B. Hypoglycämie) zum ZNS.

Im Retikulum wird der Reiz weitergeleitet

1. zur Hirnrinde, was erhöhte Aufmerksamkeit und Erforschung der Ursache zur Folge hat;
2. zum somatomotorischen System, wenn eine Bewegung erforderlich ist;
3. zum somatovisceralen System über Sympathikus und Vagus wird der Tonus der glatten Muskulatur erhöht, besonders in den Gefäßen; Blutdruck und Herzleistung werden gesteigert; der periphere Widerstand in den Hautgefäßen wird erhöht;
4. zum neuroendokrinen System: Im Hypothalamus wird ADH und Oxytocin freigesetzt. ADH und das aktivierte Renin-Angiotensin-Aldosteron System halten durch verstärkte Reabsorption von Natrium und Wasser das Volumen der Körperflüssigkeit aufrecht.

Die gleichzeitig im Nebennierenmark und den Nervenenden freigesetzten Katecholamine mobilisieren Glucose und freie Fettsäuren. Die Transportmechanismen für diese werden verstärkt. Die Glukagonfreisetzung wird erhöht und damit die Glykogenolyse in der Leber erhöht. Der Blutzuckerspiegel steigt. Gleichzeitig hemmen die KA die Insulinsekretion. Die dadurch frei werdenden freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe dienen als Brennstoff. Glucose bleibt als Brennstoff für das ZNS reserviert.

Dies ist der erste, schnellere Teil der Stressreaktion. Ein zweiter Teil stellt die Energieversorgung für längere Zeit sicher, durch Freisetzung verschiedener Hormone aus der Hypophyse (ACTH, Wachstumshormon und Prolaktin). Endorphine werden freigesetzt, um die Schmerzschwelle zu erhöhen (Vigas 1980).

## 1.2 Die Agonie als extremer Stressreiz

Die Agonie hat auf den Organismus die Wirkung eines extremen Stressreizes. Im finalen Geschehen kommt es zu einer Katecholaminausschüttung, die das Ausmaß physiologischer Regelmechanismen weit überschreitet. Berg (1966) hat die Zusammenhänge zwischen postmortalen Katecholaminkonzentrationen im Blut und agonalem Geschehen untersucht. Er stellte fest, daß bei plötzlichem Eintritt des Todes eine Katecholaminausschüttung nicht mehr erfolgt.

Lund (1964) stellte dem gewaltsamen Tod stark protrahierte Agonieverläufe gegenüber, bei letzteren fand er ein "fading away" mit sehr niedrigen Werten.

Stellt man Fälle mit kurzer Agonie (z. B. Ersticken) solchen mit langer Agonie von mehr als 30 Minuten (z. B. Herz-Kreislaufversagen oder Barbituratvergiftungen) gegenüber, so finden sich bei letzterer Gruppe fast um das Doppelte erhöhte KA-Werte. Hinsichtlich der Relation Adrenalin/Noradrenalin bei verschiedenen Todesarten differieren die Befunde noch (Berg 1966, Hohlbaum 1968, Lund 1964).

Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA) sind im stagnierenden Gefäßblut der Leiche noch 1 - 2 Tage unverändert (Berg 1950). Ihre Bestimmung ist geeignet verschiedene forensisch wichtige Differentialdiagnosen zu stützen, z. B. die Abgrenzung der echten Erstickung bei Erwürgen gegenüber dem seltenen Reflextod, durch Reizung des Sinus Caroticus. Des weiteren weist die Unterscheidung zwischen echtem Ertrinken und dem Badetod im engeren Sinne hin. Berg und Bonte (1973) fanden im Vergleich von asphyktischer und anoxischer Erstickung einen deutlichen Unterschied in der agonalen KA-Ausschüttung, was von erheblicher forensischer Bedeutung ist.

Nach längerer Stresseinwirkung werden auch im Harn höhere KA-Werte gefunden (Starlinger et al. 1969, Lukomsky 1972, Euler et al. 1975).

Hirvonen (1982) hat die KA-Konzentrationen im Urin in 24 Fällen von Erfrierungstod untersucht. Mittels Aluminiumoxydadsorbition und Fluoreszenzmethode wurden A und NA bestimmt.

Es fand sich ein Anstieg des Gesamt-KA-Gehaltes im Urin, wobei A stärker erhöht war als NA. Dies erklärt sich durch die verschiedenen Aufgaben der KA. A ist wirksam in der Bereitstellung von Glukose, welche der Wärmeerzeugung dient. Verglichen mit schnellen gewaltsamen Todesarten war die Gesamt-KA-Konzentration bei den Erfrierungstoden durchschnittlich 7fach erhöht und drei mal höher als bei natürlichem Tod.

### 1.3 Die Feststellung von Todesursachen

Die Kenntnis der Todesursache ist von erheblicher forensischer Bedeutung. Besonders, wenn mehrere Todesursachen angenommen werden können, sind geeignete Methoden vonnöten, um die verschiedenen, forensisch wichtigen Differentialdiagnosen zu stützen.

Anatomische Veränderungen bestimmten Todesarten zuzuordnen, ist nur begrenzt möglich. So sind beim Coronartod häufig keine morphologischen Veränderungen sichtbar, während man bei Kontrollpersonen in 77, 3 % der Fälle Wandveränderungen der Coronararterien von kleinen exzentrischen Herden bis zum beinahe vollständigen Verschluß finden kann (Enos 1955).

Die von Laves (1965) beschriebene zyanotische Verfärbung der Haut und der Schleimhäute nach Erstickung bzw. Ertrinken kann ebenfalls häufig fehlen.

Häufig werden chemische Methoden zur Feststellung der Todesursache angewendet. Nach Erstickungen wurden Veränderungen des osmotischen Drucks festgestellt (Yamakami 1923). Auch Aminosäuren, Milchsäure, Oxalsäure und Glukose lassen durch vermehrtes Auftreten auf Erstickung schließen (Hill 1941, Laves 1965).

Dauer und Intensität des agonalen Geschehens sind bei den einzelnen Todesarten verschieden.

Laves (1965) hat ein Schema erstellt, worin er drei Agonieformen unterscheidet:

1. Langandauernd protrahierte Agonien: Vergiftungen, Myokarditiden, Agonieverläufe bei Klinikfällen und Schädel-Hirntraumen zählen zu dieser Gruppe.
2. Fälle mit kurzer Agonie: Die Agonie liegt hier im Bereich von wenigen Minuten. Gewaltsame Todesursachen wie Erstickung, zentrale Atemlähmung bei rasch tödlichen Schädel-Hirntraumen, Verbluten und Coronarinsuffizienz lassen sich hier einreihen.
3. Fälle mit ultrakurzer Agonie: Hierher gehören der seltene Reflextod durch Reizung des Sinus Caroticus, Sekundenherztode und Unfälle mit sofort tödlicher Wirkung.

Tabelle I: Katecholamine im Urin bei Erfrierungstod  
und Kontrollgruppen( $\mu\text{g/ml}$ )  
Anzahl der Fälle in Klammern (Hirvonen 1982)

| Todesart                           | A                      | NA                     | A + NA                 |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Erfrieren                          | $0,176 \pm 0,139$ (5)  | $0,112 \pm 0,097$ (5)  | $0,206 \pm 0,169$ (24) |
| Natürlicher Tod                    | $0,031 \pm 0,025$ (8)  | $0,047 \pm 0,033$ (8)  | $0,079 \pm 0,048$ (8)  |
| Gewaltsamer Tod                    | $0,013 \pm 0,005$ (6)  | $0,015 \pm 0,023$ (6)  | $0,028 \pm 0,025$ (6)  |
| Natürlicher und<br>gewaltsamer Tod | $0,024 \pm 0,021$ (14) | $0,034 \pm 0,033$ (14) | $0,057 \pm 0,046$ (14) |

Hirvonen (1982) konnte in seiner Arbeit zeigen, daß Kälte als Stressreiz eine vermehrte Ausschüttung von A und NA bewirkt.

Die niedrigsten KA-Werte im Urin fanden sich bei plötzlichen gewaltsamen Todesarten (meist Fälle von Selbstmord).

Bei den plötzlichen natürlichen Todesarten wurde mehr NA gefunden, als bei den plötzlichen gewaltsamen Toden, was auf Stress vor dem Tod oder die Einnahme von Medikamenten hinweisen könnte.

Die Gesamt-KA-Konzentration im Plasma fand Hirvonen bei natürlichen Toden höher als bei plötzlichen gewaltsamen Toden. Aber niedrig bei Krankenhaustoden mit langsam fortschreitender Agonie.

Einen Hinweis auf die Agoniedauer nach Hirvonens Untersuchungen geben Fälle mit hohem Blutalkohol (über 200 mg/dl). In diesen Fällen war die Gesamt-KA-Konzentration im Urin stets unter 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und es sei bei diesen Fällen wahrscheinlich, daß der Tod eher eintritt als bei Nüchternheit.

Zusammen mit Erfrierungsanzeichen wie Frostbeulen, Zyanose der Haut, Schwellungen an Ohren, Nasen und Händen sowie Magenulcera sei eine Betrachtung der Katecholamine hinreichend für die Bestimmung der Todesart.

Hirvonen (1982) setzt eine Mindestkonzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Gesamtkatecholamingehalt im Urin als Hinweis auf Erfrierungstod fest, wobei mehr A als NA vorhanden sein muß.

#### 1.4 Zur Anatomie der Nebenniere

Das Nebennierenmark stammt vom Ektoderm ab und hat seinen Ursprung in der Neuralrinne. Es besitzt damit eine enge entwicklungsgeschichtliche Beziehung zu den sympathischen Ganglien, deren Zellen wie diejenigen des Nebennierenmarks Katecholamine produzieren. Man spricht deshalb auch vom adreno-sympathischen System als einer funktionellen Einheit.

Wegen der gleichartigen Anfärbbarkeit mit Chromsalzen werden die Zellen dieses Systems auch als chromaffine Zellen bezeichnet (Werning 1976).

Die Gefäßversorgung von Niere und Nebenniere erfolgt über die Arteria renalis.

Beiderseits zweigt in Höhe der A.mesenterica superior die A.renalis von der Aorta ab. Vor dem Hilus teilt sie sich in zwei oder mehr Äste für die Nierensubstanz. Ein kleiner selbständiger Ast zieht weiter zur capsula adiposa. Kleinere Äste der A.renalis ziehen als A.suprarenalis inferior weiter zur NN. Die Vena renalis liegt ventral von der Arterie und mündet in die V.cava inferior (Waldeyer 1976).

Das Nebennierenmark wird auf zwei Wegen mit Blut versorgt. Während einzelne Arterien aus dem Kapselplexus der NN direkt und ohne Abgabe von Ästen das Mark erreichen (meduläre Arterien), mündet die Mehrheit der Kapselarterien zunächst in die Sinusoide der NNR. Diese erweiterten Kapillaren geben ihr mit Rindenhormonen angereichertes Blut in kleine Venolen ab, die im cortico-medullären Grenzgebiet ebenfalls in das Kapillarnetz des NNM münden. (Muscholl 1972).

Die sympathische Nervenversorgung der NN erfolgt über den Plexus coeliacus und aorticus. Rechts und links vom Abgang des Truncus coeliacus aus der Aorta liegt je ein Ganglion coeliacum.

Im caudalen Abschnitt des Plexus liegt rechts neben dem Ursprung der A.mesenterica superior das Ganglion mesentericum superior.

An der A.renalis liegen die Ganglis renalis und das Ganglion aortico-renale.

Der Nervus splanchnicus minor aus dem 10. und 11. Brustganglion versorgt Niere und NN als sympathischer Nerv (Waldeyer 1976).

### 1.5 Steuerung der KA-Sekretion

Es besteht eine Rückkopplungssteuerung der KA-Sekretion, die sowohl auf humoralem als auch auf neuralem Weg wirkt.

Jeder Blutdruckanstieg führt über den Carotis-Sinus- und Aortenbogenreflex und das ZNS zu einer Drosselung der KA-Ausschüttung in der NN.

Aber auch ein Anstieg der AdrenalinKonzentration im Carotissinusgebiet oder im ZNS ohne Blutdruck-erhöhung auf ein bestimmtes Niveau, hemmt die Adrenalinsekretion.

Im Schock oder bei Hypoglykämie kann die Hemmwirkung erst bei höheren KA-Konzentrationen einsetzen.

Es handelt sich hier um einen Reglerkreis mit negativer Rückkopplung und variabler Einstellung (zitiert aus Blaschko Handbuch der Physiologie 1975).

## 2. Biosynthese und Metabolismus der Katecholamine

### 2.1 Biosynthese

Der Synthesehauptweg verläuft über L-Tyrosin, das im Plasma mit einer Konzentration von 18 mg/l vorliegt.

Nach dem Übertritt ins adrenerge Neuron bzw. die chromaffine Zelle wird es von der Tyrosinhydroxylase (TH) zu L-Dopa hydroxyliert. Die Dopadecarboxylase (DDC) formt dieses zu Dopamin um.

Dopamin wird in die Speichervesikel aufgenommen, wo es von dem Enzym Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) zu Noradrenalin umgewandelt wird.

In den Nebennierenmarkszellen geht das NA von den chromaffinen Granula ins Cytoplasma über, wo es von der Phenyläthanol-N-Methyltransferase (PNMT) zu A methyliert wird.

Neben der spezifischen PNMT für Phenyläthanolamine gibt es noch eine unspezifische N-Methyltransferase, welche Phenyläthyl- und Phenyläthanolamine sowie deren Analoge zu methylieren vermag (Kauert 1977).

### 2.2 Metabolismus

Für den Abbau der KA sind in erster Linie zwei Enzyme verantwortlich.

1. Die Catchol-O-Methyltransferase (COMT)
2. Die Monoaminoxydase (MAO)

Die oben genannten Enzyme können den Abbau der KA sowohl einzelnen wie auch gemeinsam aufeinanderfolgend vornehmen.

### 2.2.1 MAO

Die MAO ist in allen Drüsengeweben wie vor allem Leber und Speicheldrüsen vorhanden. Auch in Nervengewebe, glatter Muskulatur Herzmuskel und Gonaden ist MAO-Aktivität beschrieben worden. Keine oder nur ganz wenig Aktivität findet sich in Skelettmuskeln, Plasma und Erythrocyten, jedoch ist eine Aktivität in Thrombocyten beschrieben worden (Collins 1971). In der NN wird die MAO sowohl im NNM wie auch in der NNR gefunden. Im Gehirn ist das Enzym weit verbreitet, es kommt hier in Gliazellen wie auch in Synaptosomen vor.

Nach histochemischen Versuchen und Denervierungsstudien hat sich gezeigt, daß nur etwa die Hälfte der Enzymaktivität in sympathischen Nerven lokalisiert ist, die restliche Aktivität findet sich in extraneuralen Zellen (Jarrot und Iversen 1971).

Substrate der MAO sind Benzylamine, Phenyläthylamine und Indolalkylamine. Zur zweiten Gruppe gehören Tyramin, Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Metanephrin und Normetanephrin.

Im NNM ist die MAO größtenteils in den Mitochondrien lokalisiert und nur zu einem geringen Teil in den chromaffinen Granula (Wurtmann 1966).

Freigesetztes NA wird zu 95 % nach neuraler Wiederaufnahme in Vesikeln gespeichert.

Sowohl lokal synthetisiertes, wie auch wiederaufgenommenes NA wird in Granula gespeichert, die zu gleichen Teilen aus Katecholaminen, ATP und Eiweiß bestehen.

In den Granula scheinen mindestens 2 Pools von KA vorhanden zu sein.

Im Pool I besteht ein rascher Umsatz (Halbwertszeit 2 Std.). Die KA in Pool I können durch Tyramin oder andere sympathomimetische Amine und durch Nervenreizung freigesetzt werden. Anschließend kann eine Inaktivierung durch O-Methylierung in Leber und Nieren erfolgen.

In Pool II ist der Umsatz langsam (Halbwertszeit 24 Std.), die KA sind schwer mobilisierbar. Durch Auflösung der Vesikel mit Reserpin können sie medikamentös freigesetzt werden.

Die KA in Pool II werden in den Nervenenden durch in Mitochondrien lokalisierte MAO zu Aldehyden abgebaut, die sympathomimetisch inaktiv sind (Wurtmann 1966). In Leber und Nieren kann eine O-Methylierung zu VMS erfolgen (Muscholl 1972).

Nach Hemmung der intraneuralen MAO kann die Konzentration von NA in der Biophase (Rezeptorseite) nur soweit durch neurale Aufnahme vermindert werden bis sich ein Gleichgewicht zwischen Influx und Efflux in den Nervenenden eingestellt hat (Graefe et al. 1974).

Der Hauptweg zur Inaktivierung der im Blut zirkulierenden Amine ist wohl die O-Methylierung durch die COMT. Desweiteren spielt die MAO vielleicht eine wichtige Rolle bei der Zerstörung potentiell toxischer Amine, die mit der Nahrung aufgenommen wurden. Die relativ hohen Konzentrationen in Leber, Magen und Darm an MAO könnten für diese Annahme sprechen. Erhebliche Blutdrucksteigerungen von Patienten, die mit MAO-Blockern behandelt wurden, nach Aufnahme tyraminreicher Nahrung, spricht für diese Theorie (Knoll et al. 1972).

Crout (1961) findet, daß bei Hemmung von MAO und COMT in vivo die Wirkung von NA, welches i.v. appliziert wurde, nur unerheblich verstärkt wird. Er schloß daraus, daß weder MAO noch COMT einen wichtigen Inaktivierungsschritt darstellen, sondern die Wiederaufnahme in die sympathischen Nervenenden der wichtigste Inaktivierungsmechanismus ist.

Die Hemmung der MAO bewirkt eine erhöhte Ausscheidung der O-methylierten Amine Metanephrin und Normetanephrin. Die Ausscheidung von VMS ist verringert (Axelrod 1966).

Die Affinität der MAO zu Tyramin, Dopamin und Serotonin ist weitaus größer als wie zu A und NA (Wurtmann 1966).

Eine Hemmung der MAO mit Iproniazid beeinflusst Intensität und Dauer der Wirkung von endogenem oder exogenem KA in keiner Weise (Griessmer 1958). Darüber hinaus hat MAO vornehmlich eine Wirkung auf die methylierten Metaboliten von A und NA und weniger auf die Katecholamine selbst (La Brosse 1956). Das spricht für die Annahme, daß die MAO an der Inaktivierung biologisch aktiver KA nicht beteiligt ist.

### 2.2.2 COMT

#### 2.2.2.1 Lokalisation im Gewebe

Die COMT wurde 1958 von Axelrod erstmals beschrieben. Das Enzym kann alle Substanzen mit Katecholstruktur methylieren. Neben der meta-Hydroxylierung kommt auch die para-Hydroxymethylierung vor (Kuehl 1967). Das Enzym ist im Cytoplasma lokalisiert und kommt in fast allen Geweben vor. Besonders hoch ist die Konzentration in Leber und Niere (Axelrod 1959). Nach Sympathektomieversuchen zeigte sich, daß die COMT außer im Nervengewebe zu einem großen Teil auch extraneural vorkommt (Iversen 1966).

#### 2.2.2.2 Biochemische Funktion

Als Donator der Methylgruppe dient S-Adenosylmethionin. Die elektrophile Methylgruppe wird durch eine nucleophile Substitution auf die Hydroxylgruppe übertragen. Für die Reaktion ist die Anwesenheit von  $Mg^{++}$  erforderlich. Die Übertragung findet in der Regel an der stark nucleophilen meta-Hydroxylgruppe statt.

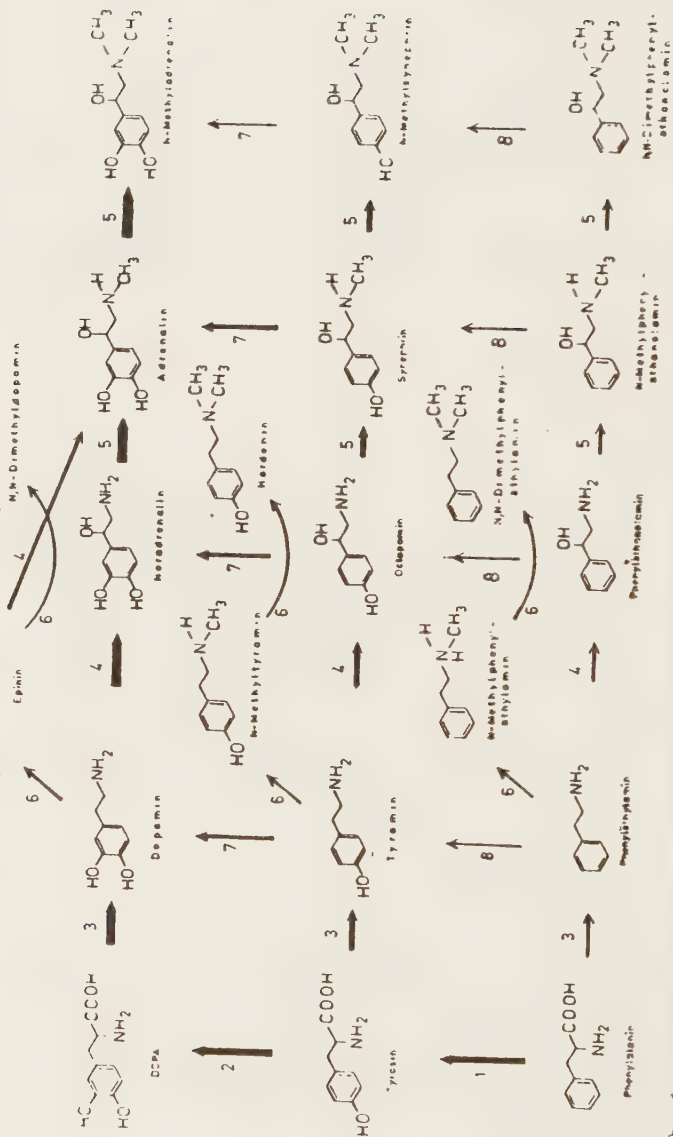


Abb. 1: Biosynthese der Katecholamine. 1 = Phenylaldehydoxylase; 2 = Tyrosinhydroxylase; 3 = Decarboxylase; 4 = Dopamin- $\beta$ -hydroxylase; 5 = Phenyläthanol-N-methyltransferase; 6 = unspezif. N-Methyltransferase; 7 = Katecholbildendes Enzym; 8 = para-Hydroxylase. (aus KAUERT, 136)



Da es sich um ein intrazelluläres System handelt, ist die Reaktion von extrazellulären Transportsystemen abhängig, sowie vom Vorrat an COMT-Proteinen und der Syntheserate von S-Adenosylmethionin, welches der limitierende Schritt der O-Methylierung im Herzen ist ( Senoh et al. 1959).

COMT ist in der löslichen Fraktion der Zelle vorhanden. Jedoch auch in der Mikrosomenfraktion der Leber wurde COMT-Aktivität beobachtet. Die mikrosomale Leber-COMT unterscheidet sich von der COMT in der löslichen Fraktion im pH-Optimum und Verteilung, bei Kaninchen und Ratte. Benzpyren und Kältestress erhöhen die mikrosomale, nicht jedoch die Leber-COMT (Iversen et al. 1966).

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Präparaten mit angereicherter COMT zeigte sich eine gewisse Heterogenität, die das Vorhandensein von mindestens zwei Isoenzymen vermuten läßt (Assicot und Bohuon 1970).

Auch Axelrod und Vesell (1970) sowie Frere und Verly (1971) haben von mindestens zwei Isoenzymen bei Säugern berichtet.

Vielleicht lassen sich Unterschiede in der Spezifität, der Lokalisation und dem Verhältnis von Meta- und Parasubstitution dadurch erklären.

### 2.2.2.3 Die physiologische Rolle der COMT

Die COMT ist an der Inaktivierung, der aus Nervenenden und NN freigesetzten KA beteiligt. Das kann in der Rezeptorzelle, den Thrombocyten und in Leber oder Nieren erfolgen (Muscholl 1972).

In Gewebezellen betrachtet man die Bildung von NMN aus NA durch die COMT als enzymatische Inaktivierung, da NMN nur etwa 1/1000 der Affinität von NA zu den  $\beta$ -Rezeptoren des Herzmuskels zeigt. Zu den  $\alpha$ -Rezeptoren der Nickhaut der Katze hat NMN eine ähnliche Affinität wie NA (Langer 1970). Die O-methylierten und desaminierten Metaboliten von NA (3-Methoxy-4-Hydroxymandelsäure) haben keinerlei pharmakologische Aktivität, so daß wahrscheinlich beide Schritte notwendig sind, um NA enzymatisch zu inaktivieren.

Da NMN eine größere Affinität zu MAO hat als NA, geht die O-Methylierung wohl der Desaminierung voraus (Tipton et al. 1972).

Die Präsenz von MAO und COMT in Gliazellen zeigt, daß eine Funktion dieser Zellen die Inaktivierung von KA aus dem synaptischen Spalt ist (Katz 1967). Die folgenden Mechanismen können an der Inaktivierung von NA im synaptischen Spalt beteiligt sein:

1. Bindung an Rezeptoren
2. Enzymatischer Abbau durch COMT und MAO
3. Wiederaufnahme in die Nervenenden durch eine Membranpumpe
4. Extraneurale Bindung an Proteine
5. Diffusion in die interzelluläre Flüssigkeit und weiter ins Blut

Bis zu 95 % des freigesetzten NA werden wieder in die sympathischen Nervenenden aufgenommen. (Katz 1967).

In Geweben mit weniger dichter adrenerger Innervation überwiegt die Abbaurole der COMT (Trendelenburg 1980).

Die COMT spielt eine größere Rolle beim Abbau von A, während für NA die Gewebefindung des unveränderten Amins von größerer Wichtigkeit scheint (Withby 1961). Trendelenburg (1980) berichtet ebenfalls, daß A vor allem durch extraneurale Aufnahme und anschließenden Abbau durch COMT inaktiviert wird, während NA vor allem durch intraneurale Aufnahme der Biophase entzogen wird.

Die neurale Wiederaufnahme hängt von der Dichte der adrenergen Innervation ab und ist eine Determinante für die extrazelluläre biologische Halbwertszeit der Amine. Sie kann durch Kokain oder Desipramin gehemmt werden (Verity 1971).

In den Nervenenden ist NA in zwei verschiedenen Speichern gelagert (Pool I und Pool II). Das in Pool I gespeicherte NA unterliegt einem raschen Umsatz und kann durch Tyramin und andere Sympathomimetika leicht freigesetzt werden. Es dient wahrscheinlich als Neurotransmitter und unterliegt einem Abbau durch die COMT.

Pool II wird langsam umgesetzt und das enthaltene Material ist von begrenzter physiologischer Wirksamkeit. Es kann durch Tyramin nur schwerlich freigesetzt werden und wird im Nerv durch die MAO abgebaut (Wurtmann 1966).

Ginn und Vane (1968) haben die Eliminierung von A und NA aus dem Kreislauf an verschiedenen Geweben studiert. A passiert den Lungenkreislauf unverändert, aber bis zu einem Drittel des NA wird in diesem Gewebe zurückbehalten.

Axelrod (1959) haben im Skelettmuskel sehr wenig von dem applizierten radioaktiv markierten A und NA wiedergefunden.

Indessen konnten Ginn und Vane (1968) zeigen, daß im Skelettmuskel große Teile der angebotenen KA inaktiviert werden können.

Das Ausmaß der O-Methylierung von KA wurde nach intravenöser Injektion von markiertem NA an Mäusen untersucht. Fünf Minuten nach der Injektion wurde der Gehalt des dekapitierten Körpers an unverändertem sowie an metabolisiertem NA bestimmt (Whitby 1959).

Axelrod (1959) führte ähnliche Versuche mit markiertem A durch.

Es folgt eine genauere Beschreibung der erwähnten Versuche.

Nach langsamer Infusion von  $H^3$ -A ( $2,5 \mu g$  freie Base/kg pro Minute) innerhalb von 30 Minuten bei Katzen, wurden diese sofort bzw. 2 Stunden später dekapitiert.  $H^3$ -A und  $H^3$ -MN überstiegen in Herz, Leber, NN, Speicheldrüse und Hypophyse die Plasmakonzentration um ein Mehrfaches.  $H^3$ -MN lag in allen untersuchten Geweben in der Größenordnung von  $H^3$ -A. Relativ hoch war die Konzentration in Herz und Leber. Im Skelettmuskel war die Konzentration der Metaboliten mehrere Male höher als der von  $H^3$ -A. 2 Stunden nach der Infusion enthielt die Milz einen größeren Betrag an MN als unmittelbar nach der Infusion. In den anderen Geweben war nur noch ungefähr die Hälfte vorhanden, außer im Muskelgewebe, wo eine deutlich höhere Konzentration vorlag.

Den Autoren gelang es, 2 Phasen des Konzentrationsabfalls im Plasma zu unterscheiden:

Der anfänglich schnelle Abfall wird durch O-Methylierung und Eiweißbindung in den Geweben bewirkt.

Der zweite langsamere Abfall im Plasma spiegelt die langsame Freisetzung aus der Eiweißbindung und die darauffolgende Metabolisierung wider (Axelrod et. al 1959).

Schnelle Injektion von  $H^3$ -A :

Innerhalb einer Minute wurden  $70 \mu\text{g}$  freie Base/kg injiziert. Zwei Minuten nach der i. v. Injektion wurden die Tiere getötet. Die Verteilung von A und MN ist im wesentlichen dieselbe wie bei langsamer Injektion. Bemerkenswert ist, daß der Betrag an MN besonders in Herz, Niere, Lunge, Leber und Muskel den von A übersteigt.

Kopin (1962) hat sofort nach i. v. Injektion von markiertem A als Hauptmetabolit MN gefunden. Er schreibt dies der hohen Aktivität der COMT im Blut zu. Nach 30 Minuten wurde die meiste Radioaktivität als 3-Methoxy-4-Hydroxymandelsäure und als konjugiertes MN gefunden.

### 2.2.3 Die extraneurale Aufnahme

Unter bestimmten experimentellen Konditionen konnte, entweder durch Hemmung der COMT (mit U-0521) oder der extraneuralen Aufnahme (mit Hydrocortison) eine Überempfindlichkeit gegenüber Katecholaminen erzeugt werden, die sich nicht additiv verhielt. D. h. wenn die Hemmung des einen Mechanismus die größtmögliche Überempfindlichkeit hervorrief, konnte durch Hemmung des Zweiten kein zusätzlicher Effekt erzielt werden. Offensichtlich folgt hier der extraneuralen Aufnahme die intrazelluläre O-Methylierung (Graefe und Trendelenburg 1974).

Es gibt eine extraneurale Aufnahme mit hohem  $K_M$  und  $v_{\max}$  mit Sättigung, die von Corticosteron gehemmt werden kann. Soweit bekannt, folgt dann eine extraneurale O-Methylierung mit niedrigem  $K_M$  und  $v_{\max}$ . Das Enzym ist intrazellulär (Trendelenburg 1963).

Die extraneurale Aufnahme kann nur eine vorübergehende Wirkung auf die extrazelluläre Aminkonzentration haben. Bönisch (1974) konnte zeigen, daß die Nettoaufnahme von Isoprenalin schnell abnahm und ein gegengerichteter Fluß vom Gewebe in den extrazellulären Raum mit der Zeit zunahm. (Isoprenalin wird nicht von den Nervenenden aufgenommen und nicht von der MAO desaminiert.)

Eine Hemmung der neuralen Wiederaufnahme erhöht für üblich die Empfindlichkeit für NA sehr stark.

Es war erstaunlich, zu finden, daß die neurale Aufnahme so erfolgreich mit der extraneuralen Aufnahme konkurriert, daß eine Überempfindlichkeit nach Hemmung der letzteren erst eintritt, nachdem auch die erstere gehemmt wird. Die extraneurale Aufnahme der KA kennt eine Sättigung, folgt der Michaelis-Menten Kinetik und wird gehemmt durch O-methylierte KA (Iversen 1965),  $\beta$ -Haloalkylamine (Iversen 1973) und verschiedene Steroide (Iversen und Salt 1970).

Die Arbeiten von Iversen wertet Trendelenburg (1980) als heute noch wichtig.

Iversen (1965) stieß in seiner Arbeit auf ein interessantes Schwellenphänomen. Bei niedrigen Konzentrationen (unter  $6 \mu\text{Mol}$ ) war offenbar keine extraneurale Ansammlung unveränderter Amine festzustellen. Iversen nahm an, daß der extraneurale Abbau der KA bei niedrigen Konzentrationen überwiegt.

Eingehende Untersuchungen geben Grund zu der Annahme, daß extraneurale Aufnahme von Aminen erst bei hohen Konzentrationen (größer als  $60 \mu\text{Mol}$ ) eine Rolle spielt. (Gillespie 1970).

Anders als in den Nervenenden finden sich im extraneuralen Gewebe keine Speichervesikel. Im Experiment können die aufgenommenen KA aus dem extraneuralen Gewebe leicht wieder ausgewaschen werden, nicht so in den Nervenenden.

Extraneurale Aufnahme ist wohl nur im Zusammenhang mit anschließendem Abbau durch die extraneurale COMT als wirksamer Eliminator aus der Biophase zu betrachten (Trendelenburg 1980).

Trendelenburg (1980) formulierte folgendes Denkmodell: Die kontinuierlich freigesetzten KA werden vorwiegend durch neurale Wiederaufnahme aus der Biophase entzogen. Darauf erfolgt eine Speicherung in Vesikeln oder die KA werden dem Abbau durch die MAO zugeführt.

Bei extremer Ausschüttung (Stress) setzt nach Überschreiten einer Konzentrationsschwelle (Iversen 1965) die extraneurale Aufnahme mit anschließender O-Methylierung der KA ein.

Die MAO hat eine wesentlich höhere  $K_M$  und  $v_{max}$  als die COMT. Trendelenburg (1980) konnte jedoch im O-methylierendem System zwei Sättigungskomponenten unterscheiden, eine mit niedriger  $K_M$  (7,5  $\mu\text{Mol}$ ) und eine mit hoher  $K_M$  (130 - 200  $\mu\text{Mol}$ ). Wobei nur der Anteil mit niedriger  $K_M$  von Hydrocortison gehemmt werden konnte. Bei Perfusionsversuchen von Rattenherzen mit Isoprenalin postulierte Bönisch (1974) ein Kompartment III und IV - in Anlehnung an den intraneuralen Pool I und Pool II. Kompartment III equilibriert schnell mit der Perfusionssubstanz und enthält COMT; das zweite füllt sich nur langsam auf und zeigt keine Enzymaktivität.

Bei Hemmung der extraneuralen Aufnahme mit Corticosteron wurde die Aufnahme von Kompartment III und IV stark beeinträchtigt. Der Efflux aus K III war jedoch weit stärker vermindert als der von K IV.

#### 2.2.3.1 Die physiologische Rolle der extraneuralen Aufnahme

Gillespie (1976) beschreibt eingehend die Möglichkeit, daß durch die extraneurale Aufnahme KA zu intrazellulären

Rezeptoren transportiert werden. Die umstrittene Existenz von intrazellulären Rezeptoren konnte Ebner (1978) anhand von  $\beta$ -Adrenozeptoren im Papillarmuskel von Meerschweinchen belegen.

Eine mögliche Funktion kann die Speicherung und spätere Abgabe unveränderter Amine sein (Henseling 1978).

Durch Hemmung der Aufnahme erzeugte Überempfindlichkeit für NA läßt Trendelenburg (1980) eindeutig auf eine Rolle als Abbauort schließen. Für einen Speicherort fordert er wesentlich höhere kinetische Konstanten. Die Rolle als Abbauort gewinnt noch an Bedeutung in Geweben mit wenig dichter adrenerger Innervation.

Belfrage (1977) fand, daß bei Hemmung der COMT bei Hunden, eine sympathische Stimulation keine verstärkte Wirkung auf die Kontraktion der Blutgefäße zeigte. Die Lipolyse war jedoch um 50 % erhöht.

Für die nicht innervierten Adrenozeptoren der Fettzellen spielt die neurale Aufnahme keine Rolle.

Einen Einfluß der neuralen Aufnahme insbesondere bei der glatten Gefäßmuskulatur auf die biologische Halbwertszeit von humoralem KA, vor allem von A aus dem NNM, sehen Paiva und Guimares (1978).

Anhand von Präparaten der Vena saphena von Hunden fanden sie, daß  $H^3$ -A hauptsächlich durch die extraneurale COMT metabolisiert wird, während das meiste  $H^3$ -NA durch neurale Aufnahme und Abbau durch die MAO beseitigt wird.

#### 2.2.4 Die Regelung der Nebennierenmarkenzyme bei Stress

Vier Enzyme sind an der Synthese von Adrenalin aus Tyrosin beteiligt: Tyrosinhydroxylase (TH), Dopamencarboxylase (DDC), Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) und Phenylethanol-N-Methyl-Transferase (PNMT).

Die Entfernung der Hypophyse bei Ratten bewirkte einen deutlichen Rückgang der Aktivität von TH, DBH und PNMT. ACTH-Gabe (aber nicht Dexamethason) an die hypophysectomierten Tiere konnte die ursprüngliche Aktivität beinahe wiederherstellen (Wurtmann und Axelrod 1966). ACTH verstärkt die Adenylcyclase-Aktivität der NNR und das gebildete cyclo-AMP erhöht den TH-Spiegel in NNR und anderen Geweben (Guidotti 1975).

NA und andere Katecholamine hemmen die TH, ein umsatzlimitierendes Enzym in der KA-Synthese. Die Hemmung ist aber nicht mit dem Substrat kompetitiv, sondern mit dem Kofaktor Tetrahydropteridin (Nagatsu 1964).

Freies intraneurales NA wird als der bestimmende Anteil in der Steuerung der NA-Synthese betrachtet. Die Ausschüttung von NA aus den Nervenenden vermindert die NA-Konzentration im Axoplasma, was seinerseits die Endprodukthemmung der TH vermindert. Die Umsatzrate von Tyrosin zu Dopa wird dadurch erhöht.

Ist andererseits die sympathische Aktivität vermindert, so sammelt sich NA im Neuron und hemmt die TH. Dieser Mechanismus erlaubt es, die NA-Synthese rasch physiologischen Gegebenheiten anzupassen, ohne den Betrag an TH zu verändern.

Die TH-Aktivität der NN wird nach Reserpingabe nicht mehr erhöht, wenn vorher der Nervus splanchnicus durchtrennt wurde.

Die neurale Steuerung der TH-Aktivität ist wirksam in der Langzeitanpassung an chronisch erhöhte sympathische Aktivität (Bhagat 1973).

Andauernde Stressreize bewirken eine Induktion der Enzyme, wobei sowohl humorale als auch neurale Faktoren eine Rolle spielen. Die TH wird hierbei hauptsächlich neural, die DBO und die PNMT durch humorale und neurale Einflüsse gesteuert (Nagatsu 1965).

### 2.2.5 KA-Metabolismus unter Stress

Nach Setzung von Hirntraumen an Meerschweinchen konnte Matlina zeigen, daß während der ersten 15 Minuten der Gehalt an A im NNM sich nicht ändert, im Blut jedoch erhöht ist. Dies, wie auch eine Erhöhung der Konzentration von DA und Dopa im NNM zeigt eine Stimulation der Syntheserate an. Im weiteren Verlauf (nach 45 Min., 100 Min. und 12 Std.) nimmt im NNM der Gehalt an A und Anaboliten ab. Dies zeigt eine anfängliche Erschöpfung der Vorräte an. Nach 12 Stunden nimmt die Konzentration auch im Blut ab (Matlina 1963).

Nach Versuchen mit verschiedenen Stressoren (Tretmühle, Unterkühlung, Immobilisierung, Schädeltraumen) teilt Matlina (1963) die Änderung der Aktivität im sympatho-adrenalen System in drei Hauptphasen ein:

1. Die schnelle Aktivierung zeigt sich sofort nach Einsetzen des Stressreizes.

Diese Phase ist durch Ausschüttung von NA im Hypothalamus und anderen Teilen des ZNS gekennzeichnet. Hierdurch wird eine Aktivierung der adrenergen Elemente des Gehirns bewirkt. Während dieser Phase kann auch eine Intensivierung der NNM-Aktivität beobachtet werden. Adrenalin wird ausgeschüttet, ohne daß sich die Konzentration im NNM ändert. Der Gehalt an KA im Herzen ist erhöht. Die Herzleistung ist deutlich erhöht.

2. Die Phase der kontinuierlichen Aktivierung ist durch weitere Abgabe von KA ins Blut unter Verminderung der Vorräte im NNM charakterisiert. Im Herzen wird NA ausgeschüttet. Die Konzentration an Anaboliten ist erhöht. Die Leber zeigt einen beachtlichen Gehalt an A, was eine starke Abnahme an Glykogen und eine Erhöhung der Glukoseversorgung der Organe bewirkt. Wegen der hohen A-Konzentration durchdringen größere Mengen an A die Blut-Liquorschranke.
3. Die dritte Phase zeigt eine Abnahme der sympatho-adrenalen Aktivität (Erschöpfungsphase). Besonders bei den humoralen und peripheren Anteilen des Systems zeigt sich ein deutlicher Rückgang. Der Adrenalingehalt der NN fällt steil ab. Die A-Sekretion ins Blut ist reduziert. Der Adrenalinspiegel im Herzen und der Gehalt an Anaboliten in allen Geweben ist vermindert. Die Blut-Liquorschranke ist für A durchlässiger.

Nachdem bei Ratten mit Rückenmarksschmerzsyndrom die Plasmakonzentration von A auf  $1/6$  und die von NA auf  $1/3$  des Ausgangswertes gesunken war, bewirkte eine Injektion von 15 mg/kg L-Dopa eine deutlich stärkere Erhöhung der KA-Konzentration als bei unversehrten Ratten. L-Dopa zeigte sich hierbei als wirksamerer Prekursor als Tyrosin.

Die stärkere Zunahme an KA, in den NN der Tiere mit Schmerzen, könnte nach Matlina auf einer Aktivierung der Biosynthese-Enzyme beruhen.

Nach der Landung von Kosmonauten fand Kvetnansky (1978) mehrfach erhöhte A- und NA-Werte im Urin der Kosmonauten zusammen mit unveränderten Metabolitenkonzentrationen. Während des kurzzeitigen Landemanövers wurde das sympatho-adrenomedulläre System extrem aktiviert.

Da die Aktivität von MAO und COMT unverändert blieb, mußte die Inaktivierung der KA vor allem über deren Konjugation stattfinden.

DA oder DA-Sulfat kann bei Stress ein Prekursor von NA werden (Unger 1979).

Dies scheint eine Erklärung für verminderte DA-Werte im Urin zu sein, die bei den Kosmonauten unmittelbar nach dem Flug gemessen wurden.

Emotional hervorgerufener Stress steigert die A-Konzentration im Plasma stärker als die von NA. Bereits kleine psychosoziale Reize haben deutlich erhöhte A-Konzentrationen im Plasma zur Folge (Kvetnansky 1978).

Die erhöhten KA-Konzentrationen bei Stress sind nicht ausschließlich durch eine verstärkte Syntheserate bedingt, sondern auch durch verminderten Abbau.

An Ratten konnte gezeigt werden, daß bei Stress eine deutlich verminderte COMT-Aktivität vorliegt (Kvetnansky und Mikulay 1971). Die Autoren führten dies auf einen inhibitorischen Effekt von Corticosteroiden zurück, welche unter Stress eine vielfach erhöhte Plasmakonzentration bei Ratten aufwiesen.

Der inhibitorische Effekt von Corticosteroiden auf die Leber-COMT wurde an Zellkulturen aus Lebergewebe nachgewiesen (Saleh und Kvetnansky 1975). Auch Parvez (1972) berichtet von einem inhibitorischen Effekt von Corticosteroiden auf KA-abbauende Enzyme.

#### 2.2.6 Katecholamine im menschlichen Urin

Es existiert eine lineare Relation zwischen dem im Kreislauf zirkulierenden NA und dem NA, das in dem Urin ausgeschieden wird (Maas und Landis 1976).

Den größten Anteil an den KA-Metaboliten hat die VMA.

Da aber nur ein relativ geringer Anteil davon aus aktivem A und NA gebildet wird, sind Rückschlüsse von der VMA auf die sympathoadrenale Aktivität nur bedingt zulässig.

Im Urin stellen HVA und Dopa sowie VMA und MOPEG etwa 80 % des Gesamtumsatzes von DA, NA und A. Diese Tatsache muß berücksichtigt werden, will man im Urin eine erhöhte KA-Produktion mit anderen Komponenten als den eben genannten nachweisen. Läßt sich auch eine Veränderung des Gesamtumsatzes nur schwer feststellen, so kann der eine oder andere Metabolit doch eine deutlich veränderte Ausscheidung zeigen. (Muskiet 1979).

Der größte Teil der ausgeschiedenen VMA entsteht durch Desaminierung von NA intraneural, worauf dann eine O-Methylierung extraneural erfolgt (Axelrod 1959). Die VMA stellt also zum größten Teil den Betrag an NA dar, der metabolisiert wird, bevor eine physiologische Wirkung erzielt werden konnte.

NMN wird aus dem Anteil von NA gebildet, welcher von den sympathischen Nervenenden durch adrenerge Reize freigesetzt und anschließend in Leber oder anderen Organen durch die COMT metabolisiert wurde.

MN stammt von dem Adrenalin, das von der NN ausgeschüttet und in der Leber oder anderen Geweben durch COMT abgebaut wurde.

Maas und Landis (1976) erhielten Beweise, woraus sie schließen konnten, daß das gesamte freie NA, konjugierte NA sowie auch NMN, das im Urin ausgeschieden wird, dem zirkulierenden NA und den Pools, die mit diesen im Gleichgewicht stehen, zugerechnet werden kann. Im Gegensatz dazu stammen die Anteile an 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure und 1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-äthan-1-2-diol aus Pools, die im Verhältnis zu Größe und NA-Syntheserate kaum von zirkulierendem NA erreicht werden.

Das könnten NA-Pools im Gehirn, NNM und intraaxonale sein. Maas und seine Mitarbeiter fanden, daß das im Urin ausgeschiedene NA nur 2 bis 3 % des Betrages an NA darstellt, der von sympathischen Nervenenden in den Kreislauf abgegeben wird. Etwa 75 % der im Urin gefundenen KA-Metaboliten stammen aus dem NA-Metabolismus oder werden aus NA gebildet, welches nicht von den Nervenenden freigesetzt wurde.

DHMA und DHPG im Urin stammen aus dem Anteil an NA, welcher intraneural desaminiert wird oder aus durch Nervstimulation freigesetztem NA, das in der Leber durch MAO abgebaut wird sowie aus Anteilen an NA, die von der NN sezerniert werden.

Ein großer Teil des von den Nervenenden freigesetzten NA erscheint überhaupt nicht im Urin, weil dieser etwa zu 95 % in die Vesikel wiederaufgenommen wird. Es ist deshalb schwierig, das Ausmaß der sympathischen Aktivität durch Messung der KA im Urin zu bestimmen. Ein großer Teil der aktiven KA wird O-methyliert, daher stehen MN und NMN in Relation zu den freigesetzten KA. Davon wird ein Teil noch weiter durch die MAO abgebaut und dann ausgeschieden.

Die gleichzeitige Bestimmung von A und MN sowie NA und NMN liefert deshalb die verlässlichsten Resultate (Wurtmann 1966).

Die im Harn ausgeschiedenen KA liegen nur zum Teil in freier Form vor. Der größere Teil ist im Glukuronsäure oder mit Schwefelsäure verestert, beim Menschen überwiegen Sulfatester.

In der folgenden Tabelle sind die täglichen Ausscheidungsmengen von KA und Metaboliten aus neueren Arbeiten aufgelistet.

Tabelle II: 24-Stunden-Ausscheidung von Katecholaminen im Urin  
Werte in  $\mu\text{g}/24 \text{ Std.}$   
Anzahl der Fälle in Klammern

|                                                                                                                                                                                                                                                                  | NA                                                      | A                                                  | DA                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| a) Methode: Aluminiumoxyd +<br>Sephadex G 10, Flüssigchromato-<br>graphie<br>Autor: Westerink (1982)<br>48 Gesunde Männer                                                                                                                                        | 41,5 $\pm$ 11,0 (48)                                    | 12,1 $\pm$ 4,5 (47)                                | 224,7 $\pm$ 60,4 (48)                                      |
| b) Methode: Borsäuregelchromatogr.<br>Modif. Trihydroxyindolmethode<br>Korrelationskoeff. f. gleich-<br>zeitig durchgeführte Flüssig-<br>chromatogr. mit elektrochem.<br>Detektor in ( $\left. \begin{array}{l} \text{Autor: Oka (1982)} \end{array} \right\}$ ) | 33,6 $\pm$ 13,9 (57)                                    | 9,3 $\pm$ 5,5 (57)                                 | 120,3 $\pm$ 57,1 (57)                                      |
| c) Methode: Aluminiumoxyd, HPLC-<br>Fluorometrie<br>Autor: Moyer (1979); gesund<br>Bluthochdruck                                                                                                                                                                 | 36,2<br>40,1                                            | (97) 8,2<br>(85) 9,0                               | (97) 204<br>(85) 194                                       |
| d) Methode: Modif. Trihydroxy-<br>indolmethode<br>Autor: Menshikov (1973); frei<br>konjugiert<br>gesamt                                                                                                                                                          | 20,2 $\pm$ 2,7 (11)<br>14,5 $\pm$ 3,2<br>34,5 $\pm$ 3,8 | 10,1 $\pm$ 1,4<br>14,3 $\pm$ 2,1<br>24,1 $\pm$ 1,9 | 132,4 $\pm$ 20,7<br>267,3 $\pm$ 105,8<br>372,5 $\pm$ 100,8 |
| e) Methode: Trioxyindolfluoro-<br>metrie<br>Autor: Lukomsky (1972)                                                                                                                                                                                               | 16,2 $\pm$ 0,8                                          | 2,51 $\pm$ 0,23                                    | ---                                                        |
| f) Methode: Biorad Ionenaus-<br>tauscher + Aluminiumoxyd, HPLC<br>mit Fluorometriedetektor<br>Autor: Anderson (1981)                                                                                                                                             | 30,5 $\pm$ 5,1 (44)                                     | 6,7 $\pm$ 1,0 (44)                                 | ---                                                        |

Tabelle III: 24-Stunden-Ausscheidung von MN und NMN im Urin  
Werte in mg/24 Std.

|                                                                                                                  | MN              | NMN             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| a) Methode Kationenaustauscher<br>HPLC<br>Autor: Flood (1981)                                                    | $0,17 \pm 0,08$ | $0,24 \pm 0,08$ |
| b) Methode: Ionenpaarextraktion,<br>Gaschromatographie<br>mit Elektronenfeinfangdetektor<br>Autor: Nelson (1979) | $0,12 \pm 0,7$  | $0,17 \pm 0,1$  |

Die Gesamtkatecholaminausscheidung im Urin beträgt normal bis 115 mg/Tag. Im Plasma finden sich normal 66 bis 390 pg/ml (Feibel 1971).

Die durchschnittliche Konzentration im Plasma liegt nach Siegenthaler (1976) bei 1 - 6 ng/ml für NA und unter 1 ng/ml für A.

Tigranian (1973) hat mit der Fluorometriemethode anhand von 50 Fällen folgende Plasmawerte ermittelt:

A  $0,38 \pm 0,01$  ng/ml      NA  $0,67 \pm 0,02$  ng/ml.

Die Halbwertszeit von i. v. injiziertem KA liegt bei 2 Minuten. Nur 5 % davon werden unverändert ausgeschieden, weitere 5 % entfallen auf vorwiegend in der Leber konjugierte KA, die restlichen 90 % werden von MAO und COMT metabolisiert (Siegenthaler 1976).

Bei der Ausscheidung von MN und NMN fanden sich nur kleine circadiane Schwingungsbreiten. Die Ausscheidung von A und NA ist jedoch sehr variabel. Bereits mäßige Muskelarbeit erhöht die NA-Exkretion deutlich (Smith und Weil-Malherbe 1962).

Das Verhältnis von A zu NA im Serum liegt bei 1 : 4 oder weniger, dementsprechend sollte sich auch das Verhältnis von MN zu NMN in dieser Größenordnung bewegen.

Das tatsächliche Verhältnis von MN zu NMN beträgt jedoch etwa 1 : 2. Der relativ kleiner Betrag an NM könnte durch schnellere Oxidation von NA im Vergleich zu A bedingt sein. Eine andere Möglichkeit könnte die Umwandlung von NMN zu MN sein, eine Reaktion, die von Axelrod (1959) beschrieben wurde.

Eine Untersuchung der Quotienten zwischen Katecholaminen und Metaboliten im Urin von Babies und Erwachsenen hat Muskiet (1979) veröffentlicht. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV aufgelistet.

Tabelle IV: Quotienten von Katecholaminen und Metaboliten im menschlichen Urin

| Personengruppen                                  |                                                          |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 8 Neugeborene<br>1 einmonatiges Baby             | NM/M = 9,55<br>(SD = 4,21 Bereich 3,89 - 17,30)          |
| 15 Personen zwischen<br>10 Monaten und 70 Jahren | NM/M = 2,88<br>(SD = 1,25 Bereich 0,98 - 5,36)           |
| kein Unterschied zw.<br>Babies u. Erwachsenen    | NA/A = 5,48 (n = 61)<br>(SD = 3,69 Bereich 1,48 - 18,69) |
| 4 Neugeborene<br>(Mittelwert $\pm$ SD)           | NA/NM = 8,5 $\pm$ 1,8 %<br>(Bereich 7,4 - 10,9 %)        |
| Ältere (17 Fälle)<br>(Mittelwert $\pm$ SD)       | NA/NM = 30,7 $\pm$ 10,5 %<br>(Bereich 16,0 $\pm$ 51,3 %) |
| 22 Fälle<br>(Mittelwert $\pm$ SD)                | DA/MOT = 521 $\pm$ 187 %<br>(Bereich 193 - 838 %)        |
| 22 Fälle<br>(Mittelwert $\pm$ SD)                | A/M = 22,7 $\pm$ 12,1 %<br>(Bereich 4,8 - 55,8 %)        |

(Muskiet 1979)

Muskiet (1979) hat die Katecholamine und die 3-O-methylierten Metaboliten im Urin bestimmt. Zur Bestimmung verwendete er die hochspezifische Kombination aus GC und Massenspektrometer. Die relativ geringe Ausbeute von 50 - 60 % der Aluminiumoxydadsorption war deshalb zur Anreicherung ausreichend.

Die in der Literatur als sehr variabel beschriebenen Wiederfindungsraten wurden durch einen mit Deuterium markierten inneren Standard korrigiert.

Zur Bestimmung der 3-O-methylierten Metaboliten war eine einfache Extraktion mit Äthylacetat bei pH 10 - 12 ausreichend. Vorher war eine organische Extraktion der biologischen Matrix mit Toluol/Isoamylalkohol (1,5 : 1) erfolgt.

Die relativ einfache Handhabung der 3-O-methylierten Metaboliten macht deren Bestimmung in der täglichen Praxis vom wirtschaftlichen Standpunkt gesehen attraktiv.

Bei der Bestimmung wurden Trimethylsilyl-N-Trifluoracetyl-Derivate verwendet.

In Tabelle Nr. V sind die Ausscheidungswerte im Urin bei gesunden Erwachsenen sowie auch das Verhältnis von jedem KA zum korrespondierenden 3-O-methylierten Metaboliten wiedergegeben. Die Verhältnisse wurden nur bei den Urinen bestimmt, bei denen alle 6 Substanzen gemessen wurden.

In den Tabellen Nr. VI und VII werden die Gesamtumsätze von DA bzw. NA + A aufgezeigt, bzw. aus den Hauptmetaboliten der durchschnittlichen Urinausscheidungen von Personen zwischen 13 und 70 Jahren errechnet.

Die Ausscheidungswerte stammen teilweise aus früher veröffentlichten Arbeiten.

Tabelle V: Urinausscheidung von KA und deren  
3-O-methylierten Metaboliten  
bei gesunden Erwachsenen

| Normalwerte<br>/ug/g Kreatinin |    |                      |           | (KA/Metabolit)<br>x 100 % |                        |           |
|--------------------------------|----|----------------------|-----------|---------------------------|------------------------|-----------|
| Substanz                       | n  | Mittelw.<br>± 1 SD   | Bereich   | n                         | Mittelw.<br>± 1 SD     | Bereich   |
| DA                             | 18 | 520 <sup>±</sup> 223 | 166 - 910 |                           |                        |           |
| MOT                            | 13 | 106 <sup>±</sup> 47  | 55 - 247  | 8                         | 591 <sup>±</sup> 157   | 395 - 838 |
| NA                             | 19 | 80 <sup>±</sup> 24   | 38 - 128  |                           |                        |           |
| NMN                            | 13 | 212 <sup>±</sup> 91  | 115 - 420 | 8                         | 35,0 <sup>±</sup> 12,6 | 18,8-51,3 |
| A                              | 18 | 12 <sup>±</sup> 6    | 3 - 23    |                           |                        |           |
| MN                             | 13 | 71 <sup>±</sup> 17   | 46 - 120  | 8                         | 20,6 <sup>±</sup> 15,8 | 4,8-55,8  |

(Muskiet 1979)

Tabelle VI: Gesamtumsatz von Dopamin  
berechnet aus den durchschnittlichen  
Urinausscheidungen der Hauptmetaboliten  
Gesunde Personen, 13 bis 71 Jahre alt

| Substanz     | Ausscheidung<br>/ug/g Kreatinin | Gesamtumsatz in % |
|--------------|---------------------------------|-------------------|
| HVS          | 4000 <sup>a</sup>               | 61,3              |
| DOPAC        | 1500 <sup>a</sup>               | 23,0              |
| DA           | 520                             | 8,0               |
| iso-HVS      | 348 <sup>a</sup>                | 5,3               |
| MOT          | 106                             | 1,6               |
| MOPET        | 32                              | 0,5               |
| DOPET        | 16                              | 0,2               |
| Gesamtumsatz | 6522                            | 99,9              |

<sup>a</sup>Nichtkonjugierte Beträge

MOPET: 3-methoxy-4-hydroxyphenyläthanol

DOPET: 3,4-dihydroxyphenyläthanol

(Muskiet 1979)

Tabelle VII: Gesamtumsatz von A und NA  
berechnet aus den durchschnittlichen  
Urinausscheidungen der Hauptmetaboliten  
Gesunde Personen, 13 bis 71 Jahre alt

| Substanz                             | Ausscheidung<br>/ug/g Kreatinin | Gesamtumsatz in % |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| VMS                                  | 1900                            | 44,8              |
| MOPEG                                | 1500                            | 35,4              |
| DOPEG                                | 325                             | 7,7               |
| NMN                                  | 212                             | 5,0               |
| DOMA                                 | 118                             | 2,8               |
| NA                                   | 80                              | 1,9               |
| MN                                   | 71                              | 1,7               |
| iso-VMS                              | 13                              | 0,3               |
| A                                    | 12                              | 0,3               |
| iso-MOPEG                            | 10                              | 0,2               |
| Gesamtumsatz                         | 4241                            | 100,1             |
| DOMA: 3,4-dihydroxyphenylmandelsäure |                                 | (Muskiet 1979)    |

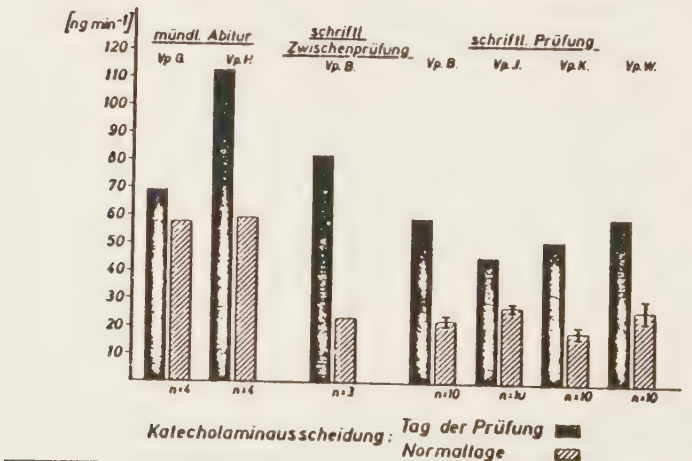
## 2.2.7 Änderung der Urinausscheidung bei Stress

Bei der Betrachtung schockierender Filme wurde die Exkretion von KA und Ketosteroiden gemessen. Die Ergebnisse zeigten, daß die Adrenalinausscheidung im Urin ein empfindlicher Gradmesser für den Einfluß von psychischen Stressreizen auf den Körper ist (Wroblesky 1973).

Der Durchschnittsgehalt von A im Urin angegeben in  $\mu\text{g/g}$  Kreatinin betrug vor dem Test  $1,86 \pm 0,8$  und nach Betrachtung der Filme  $6,61 \pm 5,8$ .

Starlinger (1969) untersuchte die KA-Exkretion am Tag der Führerscheinprüfung. Er fand eine mittlere Ausscheidung von  $71,38 \pm 20,78 \text{ ng/min}$  gegenüber einer Ausscheidung von  $48,18 \pm 9,47 \text{ ng/min}$  an Normaltagen. Eine wesentlich deutlichere Erhöhung fanden die Autoren bei der Untersuchung von Kandidaten schriftlicher oder mündlicher Prüfungen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Abb. 1: Katecholaminausscheidung an Normaltagen und Tagen mit verschiedenen Prüfungen



(Starlinger 1969)

Konzett (1971) hat die Urinausscheidung von Vasopressin, A und NA während verschiedener Stresssituationen gemessen. Als Stressor dienten Kältereiz, ischämischer Muskelschmerz und ein Konzentrationstest.

Während der Kälteeinwirkung war nur die NA-Ausscheidung deutlich erhöht, nach Muskelschmerz waren Vasopressin und A deutlich erhöht und NA nur mäßig oder gar nicht erhöht.

Während des Konzentrationstests erhöhten sich die Werte für Vasopressin, A und NA im Urin deutlich.

Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII wiedergegeben.

Tabelle VIII: Urinausscheidung von Vasopressin, A und NA nach Einwirkung verschiedener Stressoren

| Konzentrationstest     | vorher      |       | während     |       |
|------------------------|-------------|-------|-------------|-------|
| Vasopressin ( $\mu$ U) | 33,00 $\pm$ | 3,38  | 47,65 $\pm$ | 6,10  |
| A (ng/min)             | 5,52 $\pm$  | 1,26  | 11,28 $\pm$ | 2,01  |
| NA (ng/min)            | 17,53 $\pm$ | 2,16  | 21,10 $\pm$ | 2,93  |
| Kältereiz              |             |       |             |       |
| Vasopressin( $\mu$ U)  | 46,40 $\pm$ | 4,65  | 42,80 $\pm$ | 6,25  |
| A (ng/min)             | 3,50 $\pm$  | 1,11  | 5,48 $\pm$  | 1,20  |
| NA (ng/min)            | 18,59 $\pm$ | 2,29  | 23,96 $\pm$ | 4,53  |
| Muskelschmerz          |             |       |             |       |
| Vasopressin ( $\mu$ U) | 44,23 $\pm$ | 14,04 | 48,50 $\pm$ | 14,41 |
| A (ng/min)             | 4,36 $\pm$  | 0,96  | 6,30 $\pm$  | 0,44  |
| NA (ng/min)            | 14,16 $\pm$ | 2,94  | 20,49 $\pm$ | 4,76  |

(Konzett 1971)

Trotz der erhöhten Vasopressinaktivität wurden keine wesentlichen Veränderungen der Urinvolumina beobachtet, die Autoren führten dies auf fehlende Wasserdurese zurück.

O'Connor (1942) konnte feststellen, daß unter Stress-einwirkung die Wasserdurese gehemmt wird. Zwei Gründe können dafür verantwortlich sein:

1. Bei Stress erfolgt eine Vasokonstriktion in der Niere. Eine Hemmung der Wasserdurese setzt sofort ein, ist aber von kurzer Dauer.
2. Durch Ausschüttung von ADH aus dem Hypophysenhinterlappen wird der Renin-Angiotensinmechanismus aktiviert, Die Wirkung setzt später ein und ist von längerer Dauer.

Diese von Chalmers (1951) an Hunden gewonnenen Erkenntnisse wurden von Jones (1968) auch beim Menschen bestätigt.

#### 2.2.8 Änderung der KA-Exkretion bei verschiedenen Krankheiten

Beim Phäochromocytom, der bekanntesten krankhaften Veränderung der Nebennieren, handelt es sich um einen Tumor der chromaffinen Zellen. Bei dieser Erkrankung sind A, NA, O-methylierte und desaminierte KA-Metaboliten vermehrt im Urin zu finden.

Das Verhältnis von  $MN + NMN / A + NA$  beträgt bei dieser Erkrankung  $15 \pm 16$ , während es bei Gesunden im Bereich von 10 - 20 liegt. Muskiet (1979) findet daneben auch MOT erhöht, die Werte für DA sind normal. Beim Neuroblastom und Ganglioneuroblastom, einer Tumorerkrankung der Nervenzellen, werden höhere Werte von Dopa und Dopamin, den Prekursoren von A und NA, gefunden.

Die Metaboliten Methoxy-Dopa und HVS sind ebenfalls erhöht. Muskiet (1979) konnte desweiteren eine leichte Erhöhung von MN und NMN messen. Nur in 3 von 9 Fällen war auch NA erhöht. Das Verhältnis NA /NMN zeigte sich deutlich verringert auf 1,7 %.(Normale Werte: 16,0 - 51,3 %)

Beim Melanom zeigen sich im Urin abnorm hohe Spiegel von HVS, dem Hauptmetaboliten von Dopa.

Phenylketonurie wird von einer verminderten Produktion an KA begleitet, wahrscheinlich auf Grund der Hemmung der TH durch Phenylalanin. (Siegenthaler 1977).

Insulingabe kann den Adrenalingehalt im Urin auf das 10fache erhöhen. Cortisongaben vermindern NA beträchtlich, A hingegen wird nur leicht verändert (Euler 1952).

Bei Hypopituitarismus liegen die KA-Konzentrationen weit unter den Normwerten (Raab 1954).

Bei orthostatischer Hypotonie sind A- und NA-Werte im Urin sehr niedrig (Luft 1953).

Bei essentiellem Hochdruck zeigen sich keine Auswirkungen auf die KA-Ausscheidung (Burn 1953).

Nach Gabe von L-Dopa bei Parkinsonismus, zusammen mit einem peripheren Decarboxylase-Blocker erhöhte sich die Ausscheidung von DA und MOT deutlich. NMN und A waren leicht erhöht, während die Ausscheidung von NA und NM im Normbereich lag.

Bei einem Herzinfarktpatienten wurden nach Dopamin-medikation erhöhte Urinwerte von DA und MOT gemessen. NMN und MN waren leicht erhöht, die Ausscheidung von NA und A war normal (Muskiet 1979).

Muskiet (1979) berichtet, daß bei den obigen Erkrankungen durch die Bestimmung der Katecholamine A, NA und DA im Urin keine Informationen bezüglich der Diagnose erhalten werden, die nicht auch mit den Metaboliten MOT, MN und NMN oder HVS, DOPAC, VMS und MOPEG hätten erzielt werden können.

Mehr noch zeigte die Bestimmung von NA und A in einigen Fällen von Neuroblastom und Ganglioneuroblastom fälschlich negative Resultate. Folglich empfiehlt Muskiet (1979) zur Bestimmung von KA im Urin bei den beschriebenen Erkrankungen die 3-O-methylierten KA-Metaboliten zu messen.

### 2.2.9 Der Exkretionsmechanismus in der Niere

Im proximalen Nierentubulus ist ein Transportsystem zur Ausscheidung von organischen Basen (Kationen) lokalisiert. Funktionell getrennt davon existiert ein weiterer Mechanismus zur Ausscheidung organischer Säuren (Anionen).

Die Exkretion folgt der Michaelis-Menten Kinetik. Katecholamine, Histamin sowie viele Arzneimittel werden durch das System für organische Basen sezerniert (Hempel 1972). Kokain, Chininsulfat, Tolzoline und Mepiperphendiol (Darstine) dienen als kompetitive Hemmer zur Untersuchung der Transporteigenschaften (Quebbermann 1970).

Quebbermann (1970) untersuchte den aktiven Transport zur Ausscheidung von NA, A und Tyramin in den Nierentubuli von Hühnchen.

Eine Infusion von 2 bzw. 4  $\mu\text{mol/min}$  Kokain konnte die Ausscheidung von NA, A und Tyramin beträchtlich verringern. Dabei war die NA-Ausscheidung deutlich stärker gehemmt als die von A.

Die als organisches Anion vorliegende PAH wurde nicht beeinflusst.

Kopin (1961) untersuchte den Abbauweg von i. v. appliziertem, radioaktiv markiertem NA bei Ratten.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IX aufgeführt.

Die Tiere erhielten jeweils 100  $\mu\text{C}$   $\text{H}^3$ -NA. Die Radioaktivität der Metaboliten im Urin wurde gemessen.

Tabelle IX: Metaboliten im Urin nach i. v.  
appliziertem  $H^3$ -NA  
Werte in  $\mu$ Curie

|                                | frei | konj. | O-methyl. | desaminiert |
|--------------------------------|------|-------|-----------|-------------|
| Unbehandelt                    | 9    | 5     | 69        | 8           |
| MAO-Hemmung<br>mit Iproniazid  | 10   | 4     | 82        | 1           |
| COMT-Hemmung<br>mit Pyrogallol | 27   | 5     | 17        | 29          |

(Kopin 1961)

Eine weitere Untersuchung galt der zeitlichen Verteilung in der Ausscheidung der Metaboliten.

Ebenfalls 100  $\mu$ C  $H^3$ -NA wurden bei Ratten appliziert und Urinfraktionen 0 - 3 Stunden sowie 10 - 13 Stunden nach Applikation gesammelt.

Die radioaktiv markierten Metaboliten im Urin wurden gemessen. In Tabelle X sind die Ergebnisse aufgelistet.

Tabelle X: Metaboliten im Urin nach i. v.  
appliziertem  $H^3$ -NA  
Werte in  $\mu$ Curie

| Metaboliten                 | Zeitraum nach der<br>Applikation |              |
|-----------------------------|----------------------------------|--------------|
|                             | 0 - 3 Std.                       | 10 - 13 Std. |
| Total ausgeschieden         | 70,2                             | 3,94         |
| NA frei                     | 23,2                             | 1,2          |
| NA gebunden                 | 3,1                              | 5,2          |
| Desaminierte KA frei        | 0,7                              | 2,9          |
| Desaminierte KA gebunden    | 1,2                              | 4,1          |
| NMN frei                    | 12,1                             | 3,1          |
| NMN gebunden                | 17,1                             | 8,4          |
| VMS                         | 4,0                              | 13,9         |
| MOPEG                       | 32,9                             | 47,6         |
| Tritium in Metaboliten in % | 94,3                             | 86,4         |

(Kopin 1963)

### 3. Problemstellung

Die Klärung der Todesursache ist häufig aus forensischen Gründen gefordert.

Die Agonie kann als extremes Stressgeschehen gesehen werden, und es scheint möglich, aus dem postmortalen Zustand des sympathoadrenalen Systems Rückschlüsse auf die Dauer der Agonie zu ziehen.

Der KA-Spiegel im postmortalen Blut reflektiert die sympathoadrenale Aktivität zum Todeszeitpunkt.

KA-Werte im Urin stellen demgegenüber einen Pool dar, der die sympathoadrenale Aktivität über einen längeren Zeitraum vor dem Todeszeitpunkt wiedergibt.

Die KA-Sekretion des sympathoadrenalen Systems unterliegt großen interindividuellen Schwankungen. Unterschiede sind bedingt durch Alter und Gewicht, durch Krankheiten, wie Diabetes oder Schilddrüsendysfunktionen, durch Adaption an verschiedenste psychische oder physische Stressoren.

Eine weitere Erschwernis für den Vergleich von Meßergebnissen liegt in der Unkenntnis der Harnkonzentration.

Die Bestimmung mehrerer KA und deren Metaboliten erlaubt einen genauen Einblick in die aktuelle Stoffwechsellage.

Durch die Bildung von Quotienten zwischen den verschiedenen Katecholaminen sowie zwischen KA und Metaboliten werden interindividuelle Unterschiede weitgehend eliminiert.

Ein verändertes Ausscheidungsverhältnis zwischen Prekursor und KA sowie zwischen KA und Metabolit spiegelt die relative Syntheseaktivität wider.

Insbesondere KA-Hypersynthese und KA-Hypometabolismus, wodurch die Spiegel an freien Katecholaminen im Körper erhöht werden, werden so sichtbar.  
(Bolshakova 1973).

Zur Isolierung der KA sind relativ aufwendige Verfahren notwendig, da diese Stoffe bei höheren pH-Werten instabil sind, und deshalb eine einfache organische Extraktion unterbleiben muß.

Eine Vielzahl von Verfahren zur Isolierung und Bestimmung von Katecholaminen sind in der Literatur beschrieben worden:

Colorimetrie (Pisano 1969), Fluorometrie (Oka 1982), Radioimmunbestimmung (Lam 1977), Hochdruckflüssigchromatographie mit UV-Detektor (Mell 1977) oder mit fluorometrischem Detektor (Imai 1978) oder mit elektrochemischem Detektor (Kissinger 1975), Gaschromatographie mit Flammenionisation (Van de Calseyde 1971) oder mit Elektroneneinfangdetektor (Wong 1973).

Als Vorreinigungsmethoden fanden in diesen Arbeiten folgende Verfahren Anwendung:

Aluminiumoxydadsorbition (Kissinger 1975), Ionenaustauschchromatographie (Pisano 1969, Riggin 1977), Borsäure-Gelchromatographie (Higa 1977), organische Extraktion (Greer 1968), Aluminiumoxydadsorbition + Gelchromatographie (Westerink 1982), Ionenaustauscher + Gelchromatographie (Sephadex G 10) (Westerink 1982).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, die eine gleichzeitige Isolierung und Bestimmung von Tyr, DA, A, NA, MN, NMN und MOT aus postmortal gewonnenen Urinproben erlaubt.

Die gängigen Methoden zur Untersuchung von vitalen Urinproben mußten für unser Problem geeignet modifiziert werden.

Verschiedene Zerfallsprodukte, nach Zellzerfall freiwerdende Substanzen und Plasmabestandteile bilden eine stark veränderte biologische Matrix in postmortalem Urin. Die Analyse muß auf die veranlagten Konzentrationen abgestimmt werden.

Zur Analyse der Substanzen wurde die Gaschromatographie gewählt. Diese Methode ist zur Trennung von Stoffen im Molekulargewichtsbereich von 200 bestens geeignet. Die Analysezeiten sind, mit einem Mittel von 10 Minuten, relativ kurz. Die Identifizierung und quantitative Bestimmung der untersuchten Substanzen ist anhand der Chromatogramme leicht möglich.

Das gesuchte Verfahren sollte zur routinemäßigen Anwendung geeignet sein, der finanzielle Aufwand sollte sich in Grenzen halten.

Die bei den Katecholaminen, wegen deren Instabilität, problematische Wiederfindungsrate sowie die Reproduzierbarkeit der Methode sollte eine routinemäßige Analyse ermöglichen. Deshalb wurde zur Korrektur der Analysenfehler ein innerer Standard (Etilefrin) verwendet.

Die Empfindlichkeit des Verfahrens sollte im Submikrogrammbereich liegen.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir von einem von Kauert (1977) und Hiemke (1977) beschriebenen Verfahren aus, das wir für unsere Zwecke geeignet modifizierten.

#### 4. Eigene Untersuchungen

##### 4.1 Materialien und Reagenzien

###### 4.1.1 Geräte

Zentrifugengläser 100 ml mit Schraubverschluß G 32  
"Schott" und PTFE-Dichtung

Reaktionsgefäße 12 ml mit verschraubbaren Teflon-  
verschlüssen

Pasteurpipetten

Rotovapor, Büchi

Ultraschüttler

beheizbarer Aluminiumblock mit Bohrungen für Reaktionsgefäße und Zentrifugengläser (eigene Herstellung)

Glassäulen zur Ionenaustauschchromatographie (siehe Abbildung 2)

Gaschromatograph "Hewlett Packard 5840 A" mit stickstoffempfindlichem Detektor

#### 4.1.2 Substanzen

|                       |                           |
|-----------------------|---------------------------|
| L-Adrenalin-Bitartrat | Sigma Chemie GmbH München |
| L-Noradrenalin-HCl    | "                         |
| Dopamin-HCl           | "                         |
| Tyramin-HCl           | "                         |
| Methoxytyramin-HCl    | "                         |
| Metanephrin-HCl       | "                         |
| Normetanephrin-HCl    | "                         |
| Etilefrin-HCl         | "                         |

#### 4.1.3 Reagenzien

|                                    |                            |
|------------------------------------|----------------------------|
| Propionsäureanhydrid purissima     | Fluka AG, Ulm              |
| zur Gelchromatographie:            |                            |
| Sephadex LH 20                     | Deutsche Sephadex, München |
| zur Ionenaustauschchromatographie: |                            |
| Amberlite IRC 50                   | Serva, Heidelberg          |
| GC-Trennsäulenmaterial             |                            |
| Ultrapond 20 M 80 - 120 mesh       | Macherey und Nagel, Düren  |
| GC-Trennsäule                      | "                          |
| Glassäule Länge 120 cm             |                            |
| Innendurchmesser 2 mm              |                            |

#### 4.2 Hydrolyse

Die Katecholaminmetaboliten werden zur Elimination aus dem Kreislauf teilweise mit Glukuron- oder Schwefelsäure konjugiert. Beim Menschen kommen fast ausschließlich Sulfatester vor (Weil-Malherbe 1967, Richter 1940).

Um die so gebunden Amine einer Analyse zugänglich zu machen, kann man die Konjugate enzymatisch mit Sulfatase und Glukuronidase spalten. Oder man unterzieht sie einer Hydrolyse mit anorganischen Säuren.

Smith und Weil-Malherbe (1962) konnten zeigen, daß bei enzymatischer Spaltung die Anwendung von Glukuronidase unterbleiben kann, weil nur unbedeutende Mengen als Glucuronide vorliegen. Weiterhin stellten sie fest, daß die enzymatische Spaltung im Vergleich zur sauren Hydrolyse keine nennenswerten Unterschiede aufwies.

Aus diesen Gründen wurde die saure Hydrolyse bei pH 1 und 100°C für 20 Minuten von Smith und Weil-Malherbe (1962) als ausreichend empfohlen.

Wir haben die saure Hydrolyse mit 6N HCl bei pH 1 und 100°C für 20 Minuten durchgeführt. Um Verluste während der Kochzeit zu vermeiden, wurden festverschlossene Zentrifugengläser verwendet. Dadurch wurde auch ein konstanter pH-Wert garantiert.

#### 4.3 Derivatisierung

Um die für uns wichtigen biogenen Amine, für den GC trennbar zu machen, müssen sie in verdampfbare Derivate umgewandelt werden.

Hierfür ist es notwendig, die funktionellen Gruppen (Amino- und Hydroxylgruppen) chemisch umzusetzen. Die einfachste Methode zur Derivatisierung ist die Silylierung (Horning 1967, Donike 1969). Die aktiven Protonen des Moleküls werden dabei durch einen Trimethylsilylrest ersetzt.

Für uns war das Verfahren nicht geeignet, weil die Silylverbindungen im wässrigen Milieu nicht stabil sind.

Eine häufig angewandte Derivatisierung ist die Acylierung mit fluorierten Acetanhydriden (Ångard 1969). Auch dieses Verfahren ist zur Isolierung aus wässrigen Phasen nicht geeignet, weil die Acylierung erst im organischen Milieu erfolgen kann. Zweckmäßiger ist die Bildung von stabilen Aminderivaten bereits im wässrigen Milieu, in unserem Fall im Urin. Hierfür sind Acetylderivate geeignet, die durch Umsetzung im Essigsäureanhydrid gebildet werden. Brooks (1964) fand die Acetylderivate zum Nachweis am GC geeignet. Die quantitative Umsetzung der KA mit Essigsäureanhydrid ist jedoch schwierig.

Kauert (1977) fand, daß bei Verwendung längerkettiger Acetylderivate die Stabilität der Ester erhöht wird, und der Nachweis am GC verbessert wird. Er schlug Propionsäureanhydrid zur Derivatisierung vor.

Wir fanden, daß die Propionylierung mit PSA für unsere Zwecke gut geeignet war. Mit dieser Methode konnte eine Stabilisierung der KA bereits im Urin erfolgen bzw. war eine Lösung der Amine vom Ionenaustauscherharz durch die Propionylierung möglich.

#### 4.4 Lösungsmittlextraktion

Zur Vorreinigung des Urins vor der Isolierung der biogenen Amine ist die Extraktion von sauren und neutralen Harnbestandteilen mit organischen Lösungsmitteln geeignet.

Eine Extraktion mit Äthylacetat oder Äther bei pH 1 ist besonders in der Entfernung von Harnfarbstoffen wirksam (Wisser 1973).

Die Frage, ob bei der Prozedur auch ein Teil der biogenen Amine verlorengeht, konnte Kauert (1977) nach vergleichenden Untersuchungen für Äthylacetat als Extraktionsmittel verneinen.

Wir haben deshalb Äthylacetat zur Abtrennung saurer und neutraler Harnbestandteile verwendet.

#### 4.5 Gelchromatographie

Eine Trennung gleichgearteter Substanzen mittels Gelchromatographie ist möglich: auf Grund von Unterschieden in der Molekülgröße, der elektrostatischen Aufteilung und durch aromatische oder hydrophobe Adsorption ( Ångard 1969).

In der Molekülgröße der biogenen Amine bestehen nur kleine Unterschiede. Die Molekülgröße nimmt in der angegebenen Reihenfolge zu: MOT, NMN, MN, DA, NA, A.

Die Katecholstruktur ist relativ polarer als die O-methylierten Substanzen. Die tertiären Amide sind weniger polar als die sekundären Amide. Mit Gelchromatographie sind Nukleinsäuren, Aminosäuren, Vitamine und Steroide erfolgreich getrennt worden.

Der Verteilungskoeffizient ( $K_d$ ) einer Substanz ist wichtig, um abzuschätzen, in welcher Fraktion diese erscheint. Stoffe ohne Zutritt zur Gelmatrix haben einen  $K_d = 0$ , Stoffe mit teilweise Zutritt haben einen  $K_d$  zwischen 0 und 1, Stoffe mit vollem Zutritt zur Gelmatrix haben einen  $K_d = 1$ , Stoffe, die mit der Gelmatrix reagieren oder adsorbiert werden, haben einen  $K_d$  größer 1. Bei dieser Abschätzung ist zu berücksichtigen, daß in der Gelmatrix Wassermoleküle gebunden sind und dadurch der zugängliche Raum verkleinert wird.

Janson (1967) hat für Moleküle mit vollem Zugang zur Matrix einen  $K_d$  gleich 0,75 errechnet.

In unserem Fall sollte die Gelchromatographie aber nicht zur Auftrennung der verschiedenen Amine dienen. Vielmehr wollten wir mit dieser Methode die Amine von der biologischen Matrix im Urin abtrennen, um eine klarere Darstellung der Amine in den Chromatogrammen des GC zu erhalten.

Auf Grund der ähnlichen Molekülgröße war zu erwarten, daß die Amine etwa zur gleichen Zeit eluiert werden. Harnbestandteile, die vor oder nach den Aminen erscheinen, hätten abgetrennt werden können.

Verwendet wurde Sephadex LH 20, ein Gel, das mit wässrigen wie auch mit organischen Lösungsmitteln gespült werden kann. Sephadex ist ein hochpolymeres Kohlenhydrat, es ist aus Glukose aufgebaut und enthält über 90 % alpha 1 - 6 Glykosidbindungen und eine geringe Anzahl 1 - 3 Verknüpfungen (Determann 1969).

Flodin (1962) gibt ein einfaches Modell zur Wirkungsweise der Gelchromatographie. Der Verteilungskoeffizient der Lösung zwischen Gelphase und Flüssigphase wird ausschließlich durch sterische Effekte bewirkt. Die Gelmatrix bildet durch Querverbindungen Räume, die von großen Molekülen nicht passiert werden können, während kleinere Moleküle weiter in das Maschennetz eindringen, und so das Gelbett langsamer passieren.

In unserem Falle sollte eine Veränderung der Elutionszeiten in erster Linie durch Veränderung der Lösungsmittelgemische erzielt werden.

Wird die Ionenstärke der Elutionsflüssigkeit verändert, so verändert sich das Elutionsvolumen der zu trennenden Substanzen, durch Abnahme der tatsächlichen Molekülgröße (Molekül + Lösungsmittelmoleküle) bzw. durch Vergrößerung des für die Stoffe zugänglichen Gelvolumens. (Janson 1967).

Bei der Untersuchung der Gelchromatographie sind wir folgenderweise vorgegangen:

Das verwendete Gel Sephadex LH 20 wurde bei 80 °C für 3 Stunden im Lösungsmittel gequollen.

Als Säulen wurden Pasteurpipetten aus Glas mit einer Länge von 10 cm und einem Innendurchmesser von 5 mm verwendet, die nach unten mit etwas Glaswolle abgedichtet wurden.

Das gequollene Gel mußte blasenfrei in die Säulen gefüllt werden, dabei war besonders darauf zu achten, daß das Gel nicht trockenlief. Es mußte zu jeder Zeit ein Lösungsmittelüberschuß vorhanden sein, andernfalls hätte sich durch Verdichten der Gelpartikel ein geändertes Gelvolumen ergeben.

Für die Voruntersuchung wurde ein derivatisiertes Reinsubstanzengemisch verwendet.

100  $\mu$ g Reinsubstanzen wurden in 200  $\mu$ l des untersuchten Lösungsmittels gelöst und über die Säule gegeben.

Der Lösungsmittelüberschuß auf der Säule wurde mit einer Pasteurpipette entfernt, der Rest wurde gerade eben eingesickert (die Säule darf nicht trockenlaufen), dann wurde die Probe in einem Guß aufgebracht. Nachdem die Probe eben eingesickert war, wurde 2 mal mit je 200  $\mu$ l Lösungsmittel nachgespült.

Mit dem beschriebenen Vorgehen sollte erreicht werden, daß das Probengemisch in der Säule eine möglichst gerade, waagerechte Zone bildet und somit im Eluat eine Überlagerung der Substanzen, die zu verschiedenen Zeiten erscheinen, unterbleibt.

Das Eluat wurde nach Elutionsvolumen getrennt, in verschiedenen Fraktionen in Reagenzgläsern gesammelt. Anschließend wurden die Proben zur Trockene eingengt und in 1 ml Äthylacetat gelöst. Hiervon wurden Probenmengen von 1  $\mu$ l in den GC eingespritzt. Die untersuchten Amine wurden in den Chromatogrammen nach Peakfläche und Peakhöhe bestimmt. Die Verteilung der Substanzen wurde anschließend graphisch gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Ein Beispiel ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Die Verteilung der Reinsubstanzen in den nach Elutionsvolumina getrennten Fraktionen wurde mit folgenden Lösungsmittelgemischen untersucht:

Äthylacetat (ÄÄ), ÄÄ/Methanol 7 : 3, ÄÄ/Äthanol 7 : 3, ÄÄ/Äthanol 9 : 3, ÄÄ/Butanol 7 : 3, ÄÄ/Chloroform 7 : 3.

Nach diesen Voruntersuchungen haben wir postmortalen Urin, wie beschrieben derivatisiert, zur Kontrolle im GC eingespritzt. Eine andere Probe wurde, wie beschrieben, über die Sephadexsäule gegeben und die erhaltenen Fraktionen wurden wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit der zuvor in den GC eingespritzten Probe verglichen. Die in den Chromatogrammen der verschiedenen Fraktionen erschienenen Amine wurden graphisch gegen die Elutionszeit aufgetragen.

Es konnte mittels Gelchromatographie die Abtrennung der biologischen Matrix von der Aminfraktion nicht in dem gewünschten Ausmaß erreicht werden. Im Vergleich mit den ohne Gelchromatographie in den GC eingespritzten Proben konnte kein merklicher Reinigungseffekt festgestellt werden.

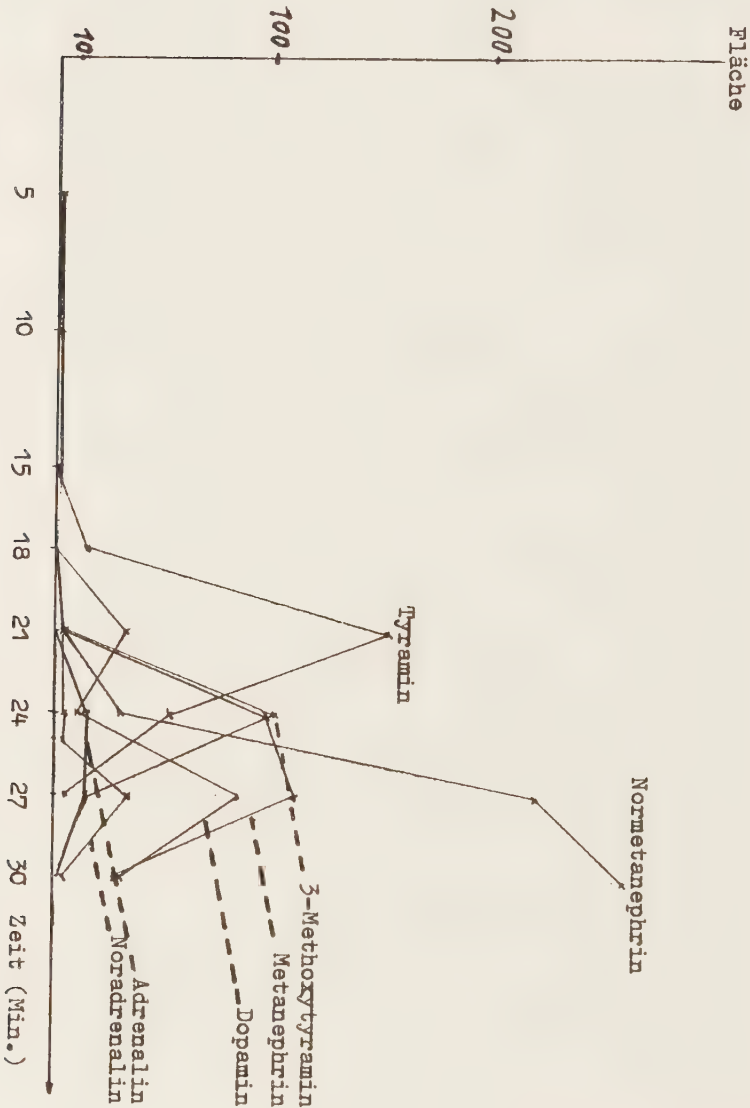
Bei weiteren Untersuchungen des Problems sollten neben anderen Lösungsmitteln und Gelen auch verschiedene Derivatisierungsmethoden auf ihre Eignung untersucht werden.

Im Anschluß haben wir die Ionenaustauschchromatographie als Vorreinigungsschritt und zur Anreicherung der Amine im Urin untersucht.

#### 4.6 Ionenaustauschchromatographie

Die Isolierung biogener Amine aus dem Urin mittels Ionenaustauschern ist möglich, da diese Substanzen als Kationen vorliegen können.

Abb. 3: U 1664/80 8 Fraktionen von Sephadexsäule  
mit Reinsubstanzen angereichert  
Äthylacetat/Äthanol (7 : 3)



Das Verfahren ist in der Literatur vielfach beschrieben worden von Pisano (1961), Perry und Schröder (1963), Atack und Magnusson (1970), Seki und Wada (1975).

Die Elution, der an das Harz gebundenen Amine, erfolgt durch pH-Verschiebung zum alkalischen oder zum sauren oder durch ein Gegenion. Diese Elutionsmethoden führen bei pH-Verschiebung zum Alkalischen zur Zerstörung der in diesem Milieu instabilen Substanzen besonders von Dopamin und Adrenalin.

Bei Elution im Säuren oder durch Gegenion erfolgt eine starke Verdünnung.

Eine viel elegantere Methode zur Elution der gebundenen Amine hat Hiemke (1977) beschrieben.

Die an die sauren Gruppen des Austauschharzes gebundenen Aminogruppen werden mit PSA zu Säureamidgruppen propionyliert. Diese tragen keine positive Ladung und binden sich deshalb nicht mehr an den Austauscher, bzw. werden hierdurch von ihm gelöst. Die entstandenen Propionyllderivate werden mit ÄÄ vom Ionenaustauscherharz eluiert. Der schwach saure Kationenaustauscher Amberlite IRC 50 hat sich hierfür als geeignet erwiesen.

Die Vorbereitung des Austauschermaterials wurde wie folgt vorgenommen.

Um den für Analysezwecke benötigten Reinheitsgrad zu erlangen, mußte das gekaufte Harz demselben Reinigungsprozeß unterzogen werden, wie bereits gebrauchtes Harz.

Gebrauchtes Harz konnte mehrere Male gereinigt und wiederverwendet werden.

Die Vorbereitung von frischem oder die Wiederaufbereitung von bereits gebrauchtem Harz erfolgte im "batch-Verfahren" nach folgendem Schema:

Ein Teil Harz (200 ml) wird

- |                                   |                    |
|-----------------------------------|--------------------|
| 1. 5 x mit je 3 Teilen aqua dest. | 10 min durchmischt |
| 2. 3 x mit je 1,5 Teilen 4N NaOH  | 30 " "             |
| 3. 2 x mit je 1 Teil ÄÄ           | 10 " "             |
| 4. 3 x mit je 1,5 Teilen 2 N HCl  | 30 " "             |
| 5. 3 x mit je 1,5 Teilen 4N NaOH  | 30 " "             |

Nach jedem Arbeitsgang 3 x mit je 3 Teilen aqua dest. 10 min lang unter Rühren waschen.

6. mit Eisessig auf pH 6,1 einstellen

Das aufbereitete Harz konnte ohne Verluste an Austauscherkapazität mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Bei längerer Aufbewahrung empfiehlt es sich jedoch, die Aufbereitung nach dem 4. Schritt zu unterbrechen, das Harz in der  $H^+$ -Form aufzubewahren und erst kurz vor Gebrauch vollständig aufzubereiten. Eine Verminderung der Austauscherkapazität nach mehrmaligem Aufbereiten wurde nicht festgestellt.

Zur Bindung der Amine wird auf die dicht gepackte Säule eine Urinprobe von 10 ml aufgebracht, die mit 0,1 N NaOH auf pH 3,5 eingestellt wurde.

Es konnte gezeigt werden, daß sich die Bindungskapazität der Säule bei pH-Werten der Proben zwischen 3 - 6 nicht wesentlich ändert und so die Nähe des alkalischen Bereichs gemieden werden kann (Hiemke 1977). Die Durchlaufgeschwindigkeit beträgt 1 ml/min. Anschließend wird 2 x mit aqua dest. gewaschen, Durchlaufgeschwindigkeit 3 - 4 ml/min.

Zur Elution der Amine wird das beladene Harz in einem Zentrifugenglas geschüttet. Hierfür hat sich die in Abbildung 13 dargestellte Vorrichtung bewährt. Eine mit 5 ml aqua dest. und 15 ml Luft gefüllte Injektionsspritze wird am Auslauf der Säule mit einer Schlauchverbindung aufgesetzt und damit der Säulinhalt in das Zentrifugenglas gespült.

Die Harzsuspension wird mit  $\text{NaHCO}_3$  gesättigt und mit 500  $\mu\text{l}$  PSA versetzt. Nach kurzem Durchmischen werden 10 ml Äthylacetat zugegeben. Um eine Schädigung der Harzkörner zu vermeiden, wird das Zentrifugenglas nun 15 min in der Hand geschüttelt.

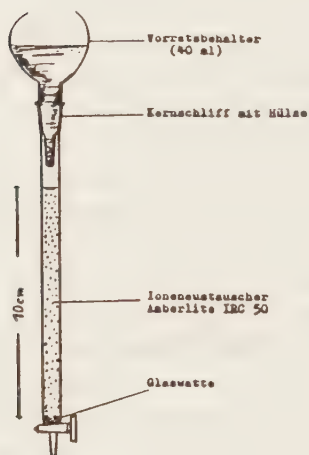
Die organische Phase wird nach 3minutigem Zentrifugieren bei 2000 Upm abgehoben. Der ganze Vorgang wird wiederholt. Die gesammelten organischen Phasen werden im Rotovapor bei 35 °C zur Trockene eingeengt.

Das Konzentrat wird in 100  $\mu\text{l}$  PSA gelöst und in einem mit Teflonstopfen fest verschlossenen Glas im Alublock bei 100 °C für 20 min nachderivatisiert.

Zur gaschromatographischen Bestimmung der Amine wird die Probe schließlich in 500  $\mu\text{l}$  ÄA gelöst.

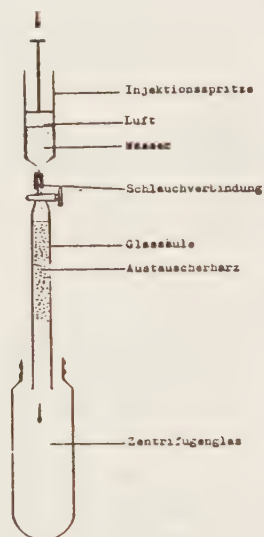
Zum Vergleich wurde derselbe Urin mit und ohne Ionenaustauschchromatographie aufbereitet. Die Abbildung 6 zeigt das Gaschromatogramm des Urins, der durch saure Extraktion bei pH 1 von sauren Metaboliten und Pigmenten befreit wurde. Eine solche Extraktion kann bei der Verwendung von Ionenaustauschern unterbleiben. In Abbildung 7 ist das Chromatogramm des Urins wiedergegeben, der mit Ionenaustauschern behandelt wurde. Das Chromatogramm in Abbildung 7 zeigt eine wesentlich deutlichere Darstellung der biogenen Amine, die Peaks sind weitgehend von Begleitsubstanzen befreit.

Abb.12: Ionenaustauscher



Der Ionenaustausch erfolgt in einer vom Glasbläser angefertigten Glassäule (s. Abb.) Der abnehmbare Vorratsbehälter dient dem leichteren Entleeren der Säule. Ein Auslaufen des Harzes wird durch Glaswatte verhindert. Die Füllmenge beträgt 10 ml.

Abb.13: Elution der Amine



Die Überführung des beladenen Harzes in ein Zentrifugenglas ist mit einer mit aqua dest. und Luft gefüllten Spritze leicht durchführbar (s. Abb.).

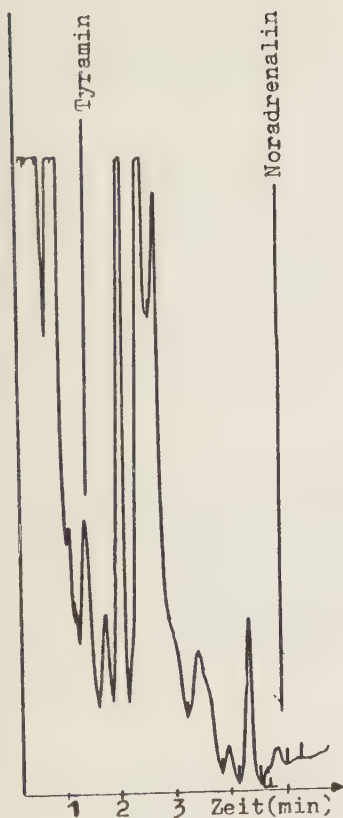


Abb. 6: U 1699/80 ohne Ionenaustauscher



Abb. 7: U 1699/80 mit Ionenaustauscher

#### 4.7 Umrechnung der Salze

Die Reinsubstanzen liegen als Salze vor. Das Molekulargewicht der freien Basen muß errechnet werden.

Das Molekulargewicht der freien Basen wurde aus der Summe ihrer Atomgewichte errechnet.

Das Molekulargewicht der Salze war bekannt.

Der Quotient von MG Salz zu MG Base ergab folgende Umrechnungsfaktoren:

|                             |                               |
|-----------------------------|-------------------------------|
| DA, MG 154, $x = 1,2$ ;     | NA, MG 169, $x = 1,2$ ;       |
| A, MG 184, $x = 1,8$ ;      | Tyr, MG 137, $x = 1,26$ ;     |
| MOT, MG 167,7, $x = 1,21$ ; | MN, MG 197,7, $x = 1,2$ ;     |
| NMN, MG 183,8, $x = 1,2$ ;  | Effortil, MG 181, $x = 1,2$ ; |

#### 4.8 Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden Reinsubstanzmengen von 200  $\mu\text{g}$  und 400  $\mu\text{g}$  als Gemisch jeweils mit und ohne Ionenaustauschersäule derivatisiert. 20  $\mu\text{g}$  Etilefrin waren als innerer Standard zugesetzt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle XI wiedergegeben.

#### 4.9 Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurde 11 mal jeweils dieselbe Probenmenge von 4  $\mu\text{g}$  Reinsubstanzen über die Säule gegeben und anschließend 200  $\mu\text{l}$  der Probe in den GC eingespritzt. Aus den 11 Chromatogrammen wurde für jede Substanz ein Mittelwert der Fläche errechnet. Die Varianz der erhaltenen Werte ist in Tabelle XII wiedergegeben.

Tab. XI: Wiederfindungsrate  
200  $\mu$ g und 400  $\mu$ g Reinstsubstanzen mit und ohne Säule derivatisiert

|     | mit Säule<br>200 $\mu$ g |          | ohne Säule<br>200 $\mu$ g |          | mit Säule<br>400 $\mu$ g |          | ohne Säule<br>400 $\mu$ g |          |
|-----|--------------------------|----------|---------------------------|----------|--------------------------|----------|---------------------------|----------|
|     | Q                        | V        | Q                         | V        | Q                        | V        | Q                         | V        |
| TYT | 8,69                     | 109,58 % | 7,93                      | 91,25 %  | 16,32                    | 133,22 % | 12,25                     | 75,12 %  |
| MOT | 8,43                     | 110,63 % | 7,62                      | 90,39 %  | 16,09                    | 137,05 % | 11,74                     | 72,96 %  |
| MN  | 4,57                     | 95,21 %  | 4,80                      | 102,12 % | 10,90                    | 148,10 % | 7,36                      | 67,53 %  |
| DA  | 5,65                     | 107,62 % | 5,25                      | 92,92 %  | 7,43                     | 80,24 %  | 9,26                      | 124,63 % |
| NMN | 3,89                     | 116,47 % | 3,34                      | 83,91 %  | 7,90                     | 144,42 % | 5,47                      | 69,24 %  |
| A   | 1,46                     | 102,82 % | 1,42                      | 97,26 %  | 2,10                     | 80,77 %  | 2,60                      | 123,80 % |
| NA  | 1,09                     | 83,20 %  | 1,31                      | 120,18 % | 2,07                     | 105,08 % | 1,97                      | 95,17 %  |

Tab. XII: Reproduzierbarkeit

$\bar{x}$  Mittelwert der absoluten Flächen von 11 Chromatogrammen  
 $\bar{x}$  von Q Quotient von  $\bar{x}$  und innerem Standard, 4  $\mu$ g Reinstsubstanzen

|     | $\bar{x}$ | s     | V    | $\bar{x}(Q)$ | s(Q) | V(Q) |
|-----|-----------|-------|------|--------------|------|------|
| TYT | 83421     | 12951 | 15 % | 1,06         | 0,10 | 10 % |
| MOT | 89296     | 7529  | 8 %  | 1,10         | 0,13 | 12 % |
| MN  | 50691     | 5458  | 11 % | 0,62         | 0,05 | 8 %  |
| DA  | 84680     | 7227  | 9 %  | 1,05         | 0,13 | 12 % |
| NMN | 53239     | 3905  | 7 %  | 0,67         | 0,07 | 10 % |
| A   | 35202     | 7386  | 21 % | 0,43         | 0,05 | 11 % |
| NA  | 25606     | 3782  | 15 % | 0,32         | 0,07 | 23 % |

#### 4.10 Erstellen einer Eichgerade

Um eine quantitative Auswertung der Gaschromatogramme zu ermöglichen, wurde für jede Substanz eine Eichgerade erstellt.

In 100 ml aqua dest. wurde die 1mg freie Base entsprechende Menge Reinsubstanzensalz eingewogen. Aus dieser Stammlösung wurden die später benötigten Mengen entnommen.

Folgende Flüssigkeitsmengen wurden aus der Stammlösung entnommen und mit aqua dest. auf 10 ml ergänzt:

100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 400  $\mu$ l, 1 ml, 4 ml.

Die Zugabe von jeweils 20  $\mu$ l Etilefrin als Standard erfolgte vor der Probenaufgabe auf die Austauschersäule.

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Gaschromatogramme wurden nach der Peakfläche ausgewertet, Der Quotient Reinstubstanz/Standard = Q wurde graphisch gegen die Probenmenge aufgetragen.

Die Steigung m der Geraden ( $y = mx$ ;  $m = (x_1 - x_2) : (y_1 - y_2)$ )) diente zur Berechnung der Substanzmenge aus den Chromatogrammen.

Die Eichgeraden sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

Für die Eichkurven wurden folgende Steigungen errechnet:

Tyr, m = 1,45; MOT, m = 1,35; MN, m = 1,05;

NMN, m = 0,9; A, m = 1,0; NA, m = 1,67;

Die Eichkurven bilden Geraden, wobei die x-Koordinate die Konzentration der Probe wiedergibt und die y-Koordinate die Peakfläche im Chromatogramm.

Die in den Analysen ausgedruckten Peakflächen wurden durch die Peakflächen des Standards dividiert und mit der Steigung m multipliziert, daraus ergab sich die Konzentration der Substanz in  $\mu$ g/10 ml.

Abb. 8: Eichgerade für Adrenalin

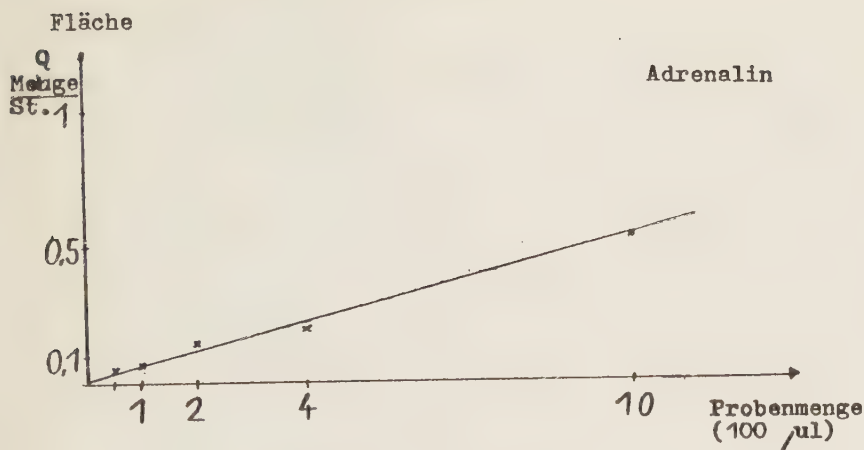
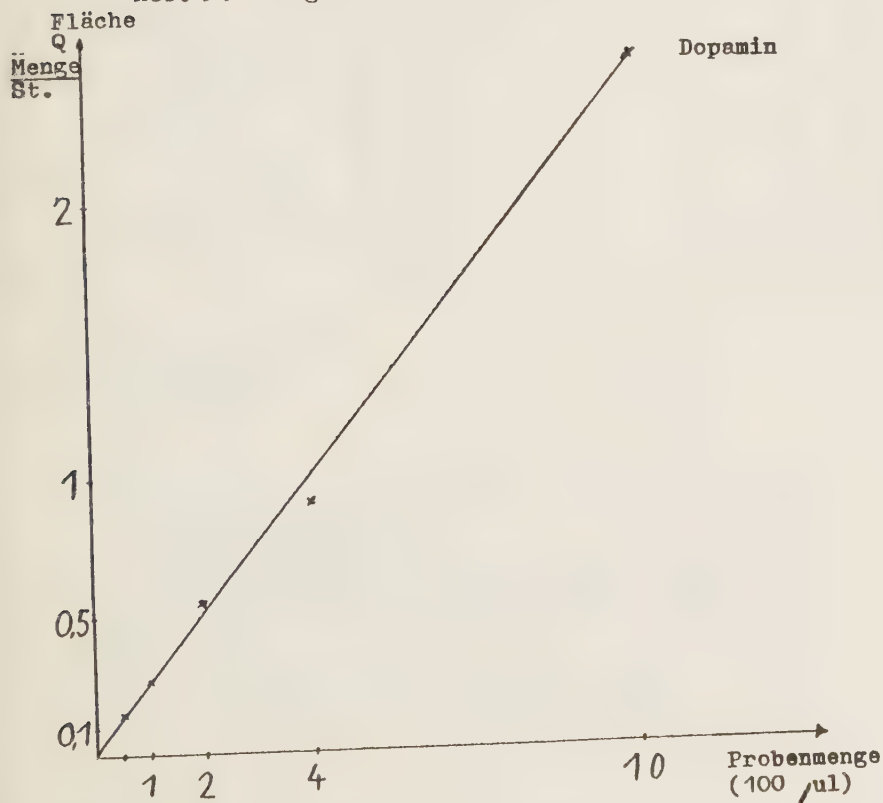


Abb. 9: Eichgerade für Dopamin



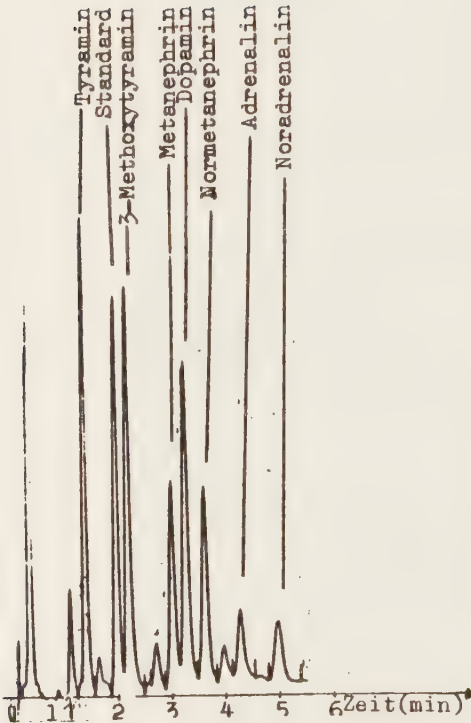


Abb. 4: 200  $\mu$ g Substanz  
Reinsubstanzmenge  
über die Säule ge-  
geben

Attenuation 8

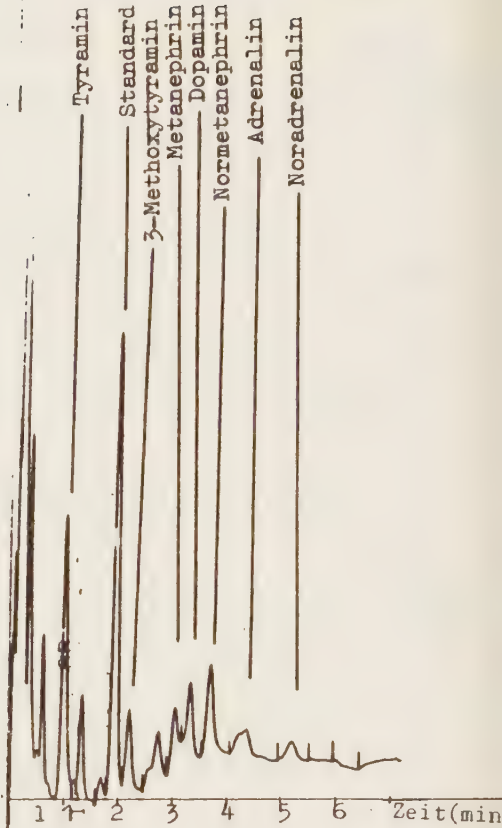


Abb. 5: 500 pg absolute  
Menge in den GC  
eingespritzt

Attenuation 6

Abbildung 4 zeigt ein Chromatogramm, wo 200  $\mu$ g Rein-  
substanzengemisch über die Ionenaustauschersäule ge-  
geben wurde. Nach Derivatisierung wurden 20  $\mu$ l im GC  
eingespritzt. Zum Nachweis der Analysengrenze des Gas-  
chromatographen wurden 500 pg absolut in den GC einge-  
spritzt. Die Reinsubstanzen sind in dem Chromatogramm  
gut aufgetrennt und quantitativ auswertbar.

#### 4.11 Leerwert

Um den Reinheitsgrad von gewaschenem Ionenaustauscherharz zu ermitteln, wurde eine Leeranalyse durchgeführt. Eine Probe von ca. 20 ml Harz wurde mit  $\text{NaHCO}_3$  gesättigt und mit 500  $\mu\text{l}$  PSA versetzt. Dem Gemisch wurde Äthylacetat beigelegt. Das Gemisch wurde 15 min mit der Hand geschüttelt. Die organische Phase wurde abgehoben, der ganze Vorgang wurde einmal wiederholt. Die organische Phase wurde zur Trockene eingedunstet und zur Nachderivatisierung mit 500  $\mu\text{l}$  PSA versetzt. Nach erneutem Eindampfen wurde die Probe mit 500  $\mu\text{l}$  ÄÄ gelöst. 20  $\mu\text{l}$  der Lösung wurden in den GC eingespritzt, das Chromatogramm ist in Abbildung 11 wiedergegeben. Es hat sich gezeigt, daß der Reinheitsgrad des Harzes ausreichend war. Geringe Verunreinigungen mußten auf nicht genügend gereinigte Gläser, Pipetten und Geräte wie z. B. den Teflonschlauch im Rotovapor zurückgeführt werden.

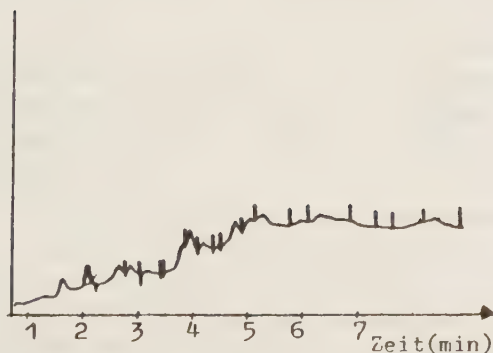


Abb. 11: Analyse von Ionenaustauscherharz  
(Leerwert)

#### 4.12 Untersuchung von postmortalem Urin

Mit der beschriebenen Methode wurde abschließend eine Untersuchung anhand authentischer Proben vorgenommen.

Die bei den Sektionen am gerichtsmedizinischen Institut entnommenen Proben wurden in 50 ml Einwegflaschen aus Kunststoff asserviert und innerhalb von 2 Stunden tiefgefroren.

Zur Untersuchung wurde das Material aufgetaut. Es gelangten jeweils 10 ml zur Untersuchung. Nach der Entnahme wurden die Proben wieder tiefgefroren. Von den 14 untersuchten Proben war die Todesursache in 9 Fällen Erhängen und in 5 Fällen Herzversagen. Bei nachgewiesenen Wiederbelebungsversuchen wurden die Proben nicht verwendet.

Die tiefgefrorenen Proben wurden im handwarmen Wasserbad aufgetaut, zwei mal 10 ml Urin wurden für eine Doppelbestimmung mit einer 10 ml Pipette entnommen und in ein Zentrifugenglas gebracht.

Mit 1 N HCl wurde die Flüssigkeit mit Hilfe eines elektronischen pH-Meters auf pH 1 gebracht. Der pH-Meter wurde jedesmal mit einer Eichflüssigkeit eingestellt.

Anschließend wurde die Probe im fest verschlossenen Zentrifugenglas für 20 Minuten in einen 100 °C heißen Alublock gebracht. Hierbei wurden die Glukuronid- und Schwefelsäureester der biogenen Amine gespalten.

Die auf Raumtemperatur abgekühlte Probe wird anschließend mit 0,1 N NaOH auf pH 3,5 gebracht.

Bei diesem Vorgang muß durch sorgfältiges Rühren vermieden werden, daß an der Eintropfstelle keine pH-Werte über 6,5 auftreten. Denn oberhalb dieses Bereiches ist Adrenalin sehr instabil. Anschließend wurde die Probe auf die Säule gegeben und wie auf Seite 54 beschrieben weiterbearbeitet.

Tab. XIII: Aminkonzentrationen in postmortalen Urinproben  
Werte in  $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$

| Sekt. Nr. | Todesursache | A    | NA   | MN   | DA   | NMN  | MOT  | TYR  |
|-----------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 100/80    | Erhängt      | 0,06 | 0,32 | 0,03 | 1,00 | 0,20 | 0,59 | 2,49 |
| 85/80     | "            | 0,02 | 0,03 | 0,09 | 1,06 | 0,45 | 2,02 | 7,86 |
| 1031/80   | "            | -    | 0,05 | 0,92 | 1,86 | 0,75 | 1,03 | 8,16 |
| 1170/80   | "            | 3,29 | 0,19 | 0,16 | 1,30 | 0,10 | 0,07 | 4,21 |
| 1070/80   | "            | -    | -    | 0,03 | 1,32 | 0,19 | 2,04 | 5,37 |
| 321/80    | "            | 3,25 | 0,10 | 0,06 | 1,27 | 0,23 | -    | 6,61 |
| 58/80     | "            | -    | -    | 0,02 | 1,04 | 0,05 | 0,63 | 0,99 |
| 1182/79   | "            | -    | 0,50 | -    | 1,04 | 0,49 | 0,64 | 8,14 |
| 325/80    | "            | 0,32 | -    | -    | 0,56 | 0,22 | 0,44 | 5,73 |
| $\bar{x}$ |              | 0,77 | 0,13 | 0,14 | 1,16 | 0,30 | 0,83 | 5,04 |
| s         |              | 1,33 | 0,16 | 0,28 | 0,33 | 0,21 | 0,70 | 2,96 |
| v         |              | 173% | 124% | 198% | 28%  | 70%  | 85%  | 58%  |
| 101/80    | Herzversagen | 0,05 | 0,15 | 0,73 | 0,82 | 0,15 | 2,12 | 1,61 |
| 1223/80   | "            | 1,64 | 0,32 | 0,03 | 0,82 | 1,16 | 1,54 | 0,38 |
| 372/80    | "            | 0,25 | 0,16 | -    | 0,41 | 0,39 | 0,35 | 5,23 |
| 320/80    | "            | 0,19 | 0,59 | 0,11 | 0,87 | 9,28 | 2,67 | 2,00 |
| 330/80    | "            | 0,37 | -    | -    | 0,47 | 0,24 | 0,46 | 1,68 |
| $\bar{x}$ |              | 0,50 | 0,24 | 0,17 | 0,68 | 2,24 | 1,43 | 2,00 |
| s         |              | 0,58 | 0,20 | 0,28 | 0,20 | 3,54 | 0,91 | 1,68 |
| v         |              | 116% | 82%  | 161% | 28%  | 157% | 63%  | 84%  |



Abb. 10: U 1170/80 mit Säule



Abb. 11: U 325/80 mit Säule

Die bei der Untersuchung der 14 authentischen Proben erhaltenen Katecholaminwerte sind in Tabelle XIII (S. 65) aufgelistet.

#### 4.13 Betrachtung der Ergebnisse postmortaler Untersuchungen

Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Proben muß sich die Betrachtung der Ergebnisse auf tendenzielle Aussagen beschränken.

Mit Durchschnittswerten verglichen liegen die erhaltenen Werte auf hohem Niveau, was bei dem Ausscheidungsverhalten der Nieren unter Stresseinwirkung zu erwarten ist. Es zeigt sich gute Übereinstimmung mit den von Hirvonen (1982) gefundenen Werten, die in Tabelle XI angegeben sind.

Wir haben aus den Katecholaminwerten der Untersuchungsreihe die Mittelwerte errechnet. Mit diesen Mittelwerten bildeten wir Quotienten (z. B. A : NA, NA : DA, MN : A, NMN : NA).

Bei der Gegenüberstellung Der Quotienten von "Herzversagen" und "Erhängt" lassen sich deutliche Unterschiede ablesen, welche eine eingehendere Untersuchung sinnvoll erscheinen lassen.

Die Gegenüberstellung der Quotienten ist in Tabelle XIV wiedergegeben.

Tab. XIV: Quotienten, gebildet mit den Durchschnittswerten  $\bar{x}$  aus unserer Untersuchungsreihe

|                   | A : NA | NA : DA | MN : A | NMN : NA |
|-------------------|--------|---------|--------|----------|
| Erhängt           | 5,92   | 0,11    | 0,18   | 0,16     |
| Herzversagen      | 2,08   | 0,27    | 0,34   | 9,3      |
| physiol.<br>Werte | 0,15   | 0,17    | 0,5    | 4        |

Das gefundene Verhältnis von A : NA ist größer als 1. Das stimmt mit bisher gemessenen Werten überein.

A ist im akuten Stress stets mehr erhöht als NA, was nach Axelrod bis zur Umkehrung des physiologischen Verhältnisses führen kann. Tigranian (1978) fand nach der Landung von Astronauten 5fach erhöhte A-Werte und 3- bis 4fach erhöhte NA-Werte im Urin.

Die stärkere Erhöhung von A ist mit dessen spezifischer Aufgabe im Stressgeschehen zu erklären.

A dient zur Mobilisierung von Energiereserven und ist besonders bei emotional bedingtem Stress stark erhöht.

Konzett fand bei emotional bedingtem Stress etwa dreifach höhere AdrenalinKonzentrationen im Urin, als bei durch Kälte oder Schmerz ausgelösten Stressreaktionen (Konzett et al. 1970).

Bereits geringe psychosoziale Reize bei Ratten bewirkten eine deutliche Erhöhung der AdrenalinKonzentration im Plasma (Kvetnansky 1978).

Ein weiterer Grund für relativ erhöhte A-Werte ergibt sich durch die weitaus stärkere Wiederaufnahme von NA in den Nervenenden im Vergleich zu A.

Im Verhältnis NA : DA zeigt sich beim Herzversagen eine Erhöhung von 0,17 auf 0,27. Das könnte auf eine Verminderung von DA zurückzuführen sein. Eine solche ist zu erwarten, wenn DA im Stress als Prekursor vermehrt Verwendung findet. Tigranian (1978) beschreibt in seiner Arbeit die Verminderung von DA beim kurzdauernden Landestress der Kosmonauten. Er führt dies auf die verstärkte Verwendung von DA und DA-Sulfat als Prekursor in der AdrenalinSynthese zurück.

Im Verhältnis MN : A zeigt sich bei Erhängten und Herzversagen eine relativ erhöhte Exkretion von A, wobei dieser Effekt bei Erhängten gegenüber Herzversagen doppelt so stark ist.

Bei schnellen Todesarten ist dieser Effekt zu erwarten. Die initial hohe Adrenalinausschüttung der NN hat hohe Urinkonzentrationen zur Folge. Eine Metabolisierung in größeren Mengen von A zu MN konnte aber nicht mehr stattfinden.

Generell läßt sich sagen, daß die Aktivität des sympathoadrenalen Systems im Stress durch Katecholaminhyper-synthese und Katecholaminhypometabolismus gekennzeichnet ist. Dies führt zu erhöhten Konzentrationen von freien Katecholaminen im Plasma.

Bei Stressversuchen am Menschen fand Bolshakova (1980) die Quotienten  $DA : D$  oder  $NA : DA$  erhöht. Das Verhältnis  $VMS : (A + NA)$  war auf 10 - 40 % des Normalwertes vermindert.

Im Verhältnis  $NMN : NA$  ist bei Erhängten die relative NA-Konzentration stark erhöht. Bei Herzversagen ist eine stark verminderte relative NA-Konzentration festzustellen.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in der KA-Konzentration im Urin von Erhängten und nach Herzversagen auf. Eine genaue statistische Untersuchung mit einer größeren Zahl von Proben scheint uns vielversprechend. Deutliche Unterschiede in den KA-Konzentrationen bei verschiedenen Todesarten sind zu erwarten.

#### 4.14 Diskussion

Ziel unserer Arbeit war es, eine Aufbereitungsmethode für postmortale Urinproben zu entwickeln, die eine gleichzeitige qualitative und quantitative Bestimmung von Katecholaminen und deren O-methylierten Metaboliten ermöglicht.

Die Agonie ist als ein extremer Stressor für den Organismus zu sehen. Sie führt, wie jedes Stressgeschehen, zur vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen ins Gewebe und in den Blutkreislauf. Ein geringer Teil der zirkulierenden Amine (ca. 20 %) wird nach O-Methylierung in Thrombocyten, extraneuralen Gewebezellen, Leber und Nieren im Urin ausgeschieden. Der Rest wird durch Wiederaufnahme in die Nervenenden und durch Speicherung im extraneuralen Gewebe aus dem Blutkreislauf beseitigt.

In den ersten Minuten nach der Ausschüttung werden größere Mengen von Katecholaminen unverändert und nach Konjugation durch die Nieren ausgeschieden.

Die Metabolitenkonzentration ist zu diesem Zeitpunkt noch unverändert. Tigranian (1978) konnte das in seiner Arbeit über den kurzdauernden Landestress von Kosmonauten gut zeigen.

Die von Iversen (1972) und Trendelenburg (1980) untersuchte extraneurale Aufnahme transportiert die zirkulierenden KA in Gewebespeicher, wo eine O-Methylierung erfolgt.

Durch geeigneten Vergleich der Werte von KA, Prekursoren und Metaboliten im Blut, Urin und Gewebe sollten Rückschlüsse auf die KA-Stoffwechsellage zum Todeszeitpunkt gezogen werden können. Insbesondere sollte sich eine Aussage über die Dauer und Intensität der Agonie machen lassen.

Zur gleichzeitigen Betrachtung von Prekursoren, KA und deren Metaboliten bietet sich die Bildung von Quotienten an.

Das Verhältnis DA : Dopa und NA : DA spiegelt die relative KA-Syntheseaktivität wider und ist bei Stress erhöht. Insbesondere KA-Hypometabolismus und KA-Hypersynthese, die den Spiegel an freien KA im Körper erhöhen, werden von diesen Quotienten sichtbar gemacht. (Bolshakova 1978).

Das Verhältnis A : NA zeigt die Prädominanz des hormonellen oder des übermittelnden Teils im sympatho-adrenalen System auf.

Beträgt das Verhältnis A : NA im Urin normalerweise 1 : 4, so kann dies im akuten Stress auf Werte über 1 ansteigen (Kvetnansky 1978, Hirvonen 1982).

Dies beruht darauf, daß beim Stress (besonders bei emotionalem Stress) A stets in stärkerem Maße ansteigt als NA. Desweiteren unterliegt NA in viel größerem Maße der neuralen Wiederaufnahme in Speichervesikel als A (Trendelenburg 1980). Auf physiologischer Ebene liegt dem zugrunde, daß A über die beta-Rezeptoren in weitaus größerem Maße an der Bereitstellung von freien Fettsäuren und Glukose sowie an der Erhöhung der Herzleistung beteiligt ist, als NA.

Weitere sinnvolle Quotienten im Katecholaminstoffwechsel sind: HVS : DA, VMS : A + NA, MN : A, NMN : NA, VMS : MN + NMN (Bolshakova 1978).

Eine wichtige Arbeit zu dem Thema hat Hirvonen (1982) veröffentlicht. Er vergleicht die KA-Konzentrationen bei Erfrierungstoden und gewaltsamen Todesarten.

Hirvonen (1982) betrachtet in seiner Arbeit aber nur die Konzentration von A und NA im Urin, was bei Erfrierungstoden im Zusammenhang mit Auffindungsort und verschiedenen Erfrierungsanzeichen als Hinweis auf die Todesursache ausreichend scheint.

Will man Aussagen über die Todesursache an allgemeinerem Sektionsgut machen, erscheint uns eine Betrachtung aller am KA-Stoffwechsel beteiligten Substanzen als unerlässlich.

A und NA wirken im gleichen Sinne auf die Niere, indem sie die Hämodynamik der Niere beeinflussen und damit indirekt Veränderungen der Nierenfunktion hervorrufen. Sie bewirken eine Konstriktion der Vas efferenz der Niere und setzen den renalen Plasmadurchfluß herab. Die Filtrationsrate bleibt zunächst unverändert und nimmt durch den Blutdruckanstieg sogar zu. Der beschriebene vasotrope Effekt der KA wird unterstützt von einem chemotropen Effekt, der über das Renin-Angiotensinsystem eine Antidiurese bewirkt (Werning 1976). Nach starker Stresseinwirkung auf den Organismus wird also konzentrierter Urin ausgeschieden. Die KA-Konzentrationen liegen auf einem hohen Niveau. Die Adrenalinkonzentrationen steigen bis zum 5fachen des physiologischen Wertes, die NA-Werte sind 3- bis 4fach erhöht.

In der medizinischen Praxis werden Urinwerte in der Regel im 24-Stunden-Urin gemessen. Durch diese Standardisierung erhält man vergleichbare Harnkonzentrationen.

Eine zweite Möglichkeit zur Standardisierung besteht in Wertangaben pro g Kreatinin.

In Unkenntnis der Harnkonzentration haben wir die absoluten KA-Konzentrationen bestimmt. Durch Quotientenbildung wurde eine Relativierung der Harnkonzentration erreicht, die eine Standardisierung über die Kreatininausscheidung überflüssig macht.

Die Bestimmung der KA-Werte im Blut gibt Auskunft über die momentane Situation. Im Leichenblut ist also der KA-Spiegel so, wie er zum Todeszeitpunkt bestanden hat.

Demgegenüber findet sich im Urin ein Katecholaminpool, der einen längeren Zeitraum widerspiegeln kann. Treten unter Stresseinwirkung hohe KA-Konzentrationen auf, so werden während des gesamten Zeitraums auch große Mengen in der Niere ausgeschieden. In den ersten Minuten der Ausschüttung gelangen größere Mengen nicht-metabolisierte Katecholamine zur Ausscheidung in freier Form, oder auch als Konjugate. In der Folge werden auch größere Mengen metabolisierter Katecholamine ausgeschieden.

Weitergehende Arbeiten müssen die Zeitabläufe der Katecholaminausscheidung eingehender untersuchen. Dies wird unter anderem dadurch erschwert, daß die Nierenfunktion im Stressgeschehen nicht konstant bleibt. Erhöhte Mengen an A und NA im Blut bewirken eine Konstriktion der Nierengefäße, wodurch der Blutdurchfluß verringert wird. Die erhöhte Reizleitung der sympathischen Nerven (N.Splanchnikus, Ganglion renale) bewirkt ebenfalls verringerte Blutzufuhr zur Niere. Dieser "vasotrope Effekt" wird begleitet von einem direkten "chemotropen Effekt", durch welchen im juxtaglomerulären Apparat Renin freigesetzt wird. Der Renin-Angiotensinmechanismus bewirkt ebenfalls eine Antidiurese (Werning 1976).

In unserer Arbeit wollten wir versuchen, ein von Kaurert (1977) und Hiemke (1977) beschriebenes Verfahren zur Isolierung von Katecholaminen an postmortale Verhältnisse zu adaptieren.

Zunächst untersuchten wir zusätzlich die Eignung der Gelchromatographie als Vorreinigungsschritt. Es sollte durch geeignete Fraktionierung des Eluats eine Abtrennung der organischen Matrix von den Aminen erzielt werden.

Bei zunächst methodischen Studien untersuchten wir Reinsubstanzen auf ihr Elutionsverhalten. Ziel war es, eine möglichst eng begrenzte Aminfraktion zu erhalten. Hierfür wurden verschiedene organische Lösungsmittelkonzentrationen untersucht. Im Anschluß wurden authentische Proben zunächst mit, später ohne Anreicherung mit Reinsubstanzen aufgearbeitet.

Es gelang bei unseren Untersuchungen nicht, die Katecholamine in einer kleinen Fraktion zu begrenzen. Vielmehr wurden diese über das gesamte Elutionsvolumen verteilt zusammen mit den anderen Urinbestandteilen ausgespült.

Wir haben die Gelchromatographie aus diesem Grund aufgegeben.

Für eine weitere Untersuchung der Methode sollten weitere Lösungsmittel geprüft werden. Wir möchten auf eine Arbeit von Westerink (1982) hinweisen, dem eine Trennung der Katecholamine von anderen Urinbestandteilen mit 0,1 Mol/l Trichloressigsäure + 150 ml/l Methanol auf Sephadex G 10 gelingt. Er macht diesen Schritt jedoch erst im Anschluß an ein Ionenaustauschverfahren.

Ångaard (1969) erzielte eine Auftrennung der Katecholamine auf Sephadex LH 20 mit einem Dichloräthanol-Methanol-Gemisch, wobei die Amingruppen vorher mit Perfluorsäureanhydrid derivatisiert wurden. Bei weiteren Untersuchungen sollte die Derivatisierung in Betracht gezogen werden.

Greer (1968) hat Trifluoressigsäureanhydrid zur Derivatisierung der Katecholamine bei der Gelchromatographie benutzt.

Verändertes Molekularsiebverhalten eines Gels kann durch Erhöhung der Ionenstärke des Lösungsmittels modifiziert werden, wodurch das tatsächlich zugängliche Gel verändert wird (Burtis 1970). Da die untersuchten Substanzen eine einheitliche Molekülgröße haben, könnte durch Veränderung des Molekularsiebverhaltens des Gels eine erwünschte Abtrennung von Stoffen anderer Größe erreicht werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Ionenaustauschchromatographie zur Vorreinigung des Urins verwendet. Die Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit der erarbeiteten Methode sind so gut wie bei anderen beschriebenen Analyseverfahren, die jedoch nicht alle die von uns bestimmten Amine erfassen.

Bei der Untersuchung von 12 authentischen Proben konnten wir zeigen, daß die Methode einfach und routinemäßig anwendbar ist. Die auf dem GC erhaltenen Chromatogramme zeigen keine Überlagerungen und sind gut auswertbar. Mit der Erfassung aller basischen KA-Metaboliten ist ein genaueres Bild der prämortalen Stoffwechsellage zu erhalten.

Die von uns ermittelten postmortalen Aminkonzentrationen liegen vergleichsweise auf hohem Niveau. Es zeigt sich gute Übereinstimmung mit den von Hirvonen (1982) gefundenen Werten.

Wie von Axelrod beschrieben, zeigt sich eine Umkehrung des Verhältnisses von A : NA, das Verhältnis von NA : DA ist bei Herzversagen erhöht, was auf eine Verringerung der DA-Ausscheidung hindeutet. Dies ist bei akutem Stress zu erwarten, da DA als Prekursor vermehrt Verwendung findet. Niedrige Werte von DA bei kurzandauerndem Stress hat Tigranian (1980) gemessen.

Durch den Vergleich der postmortalen KA-Konzentrationen in verschiedenen biologischen Matrizen scheint uns eine Aussage über die Dauer und Intensität der Agonie möglich zu sein.

#### 4.15 Zusammenfassung

Ziel eines größeren Forschungsprogrammes ist es, aufgrund von quantitativen Daten des KA-Stoffwechsels aus verschiedenen biologischen Matrizen (Nebenniere, Blut, Urin) einen Überblick über die prämortale Stoffwechsellage der Katecholamine zu erhalten.

Wir haben uns in dieser Arbeit mit der Isolierung und Bestimmung der Katecholamine im Urin befaßt. Mit den KA sollten gleichzeitig die basischen Metaboliten bestimmt werden. Durch die vergleichende Betrachtung von Metaboliten und Katecholamin erhalten die Werte größere Transparenz und vermitteln ein genaueres Bild des abgelaufenen KA-Stoffwechsels. Die Stresshormone A und NA werden auch in der Agonie in großen Mengen von Nebenniere und sympathischen Nerven abgegeben. In den Nieren werden sie unverändert, konjugiert oder metabolisiert, ausgeschieden und sammeln sich während der ganzen Agoniedauer im Urin. Es sind also große Mengen der gesuchten Substanzen zu erwarten.

Scott (1968) konnte mit einem hochauflösenden Anionenaustauscher mit UV-Detektor über 150 Bestandteile im menschlichen Urin unterscheiden. Die ungenügende Auflösung läßt vermuten, daß viele Peaks sich aus mehreren Stoffen zusammensetzen.

In Urinproben, die von Sektionsgut stammen, sind zusätzliche Stoffe zu erwarten, wie etwa Albumine bei prämortalem Hochdruck, Fäulnisprodukte (z. B. Tyramin) und durch Zersetzung der Zellwände freiwerdendes Zellmaterial.

Zur Vorreinigung des Urins suchten wir ein leistungsfähiges, schnell und routinemäßig arbeitendes, aber auch preiswertes Verfahren. Mit dem Verfahren sollten alle von uns gesuchten Substanzen gleichzeitig erfaßt und bestimmt werden können. Aufgrund der ähnlichen Molekülgröße und der engen biochemischen Verwandtschaft der Substanzen schien uns die Gelchromatographie als Vorreinigungsschritt geeignet.

Zunächst betrieben wir methodische Studien der Gelchromatographie. Ein Reinsubstanzgemisch der gesuchten Substanzen wurde auf die mit Sephadex LH 20 gefüllten Säulen gegeben und mit verschiedenen organischen Lösungsmittelgemischen eluiert.

Das Eluat wurde nach Elutionsvolumen oder Elutionszeit fraktioniert. Nach der Derivatisierung mit PSA wurden die Fraktionen im GC auf die enthaltenen Reinsubstanzen untersucht.

Das besondere Ziel bei diesen Studien war, die Lösungsmittel wie auch die Fraktionierung des Eluats so zu modifizieren, daß die Substanzen in einer möglichst eng begrenzten Fraktion erhalten werden.

Im Anschluß wurden verschiedene Urinproben aufgearbeitet, die mit Reinsubstanzen angereichert waren. Später wurden authentische Proben in Parallelbestimmung mittels saurer Extraktion und Gelchromatographie aufgearbeitet.

Der Vergleich der erhaltenen Chromatogramme zeigte keine wesentlichen Unterschiede, so daß die Methode verlassen wurde.

Statt dessen wurde die Ionenaustauschchromatographie zur Anreicherung der Amine verwendet. Wir gingen von einem von Kauert (1977) und Hiemke (1977) beschriebenen Verfahren aus, das für unsere Zwecke geeignet modifiziert wurde.

Als Ionenaustauscher diente Amberlite IRC 50, ein schwach saurer Kationenaustauscher.

Beim Ionenaustauschverfahren werden die Amingruppen an die sauren Gruppen des Harzes gebunden. Dadurch wird eine gegenüber der sauren Extraktion wesentlich spezifischere Trennung erreicht. Zur Elution wurde ein von Hiemke (1977) beschriebenes Verfahren angewendet, wobei die Amine mit Derivatisierung durch PSA in Säureamidgruppen umgewandelt und dadurch vom Harz gelöst werden.

Durch die Derivatisierung mit PSA gelingt eine Stabilisierung der Amingruppen, gleichzeitig wird eine starke Verdünnung, wie bei der Elution im Säuren, vermieden. Zunächst wurden methodische Studien mit Reinsubstanzen angestellt. Der Leerwert von bereits gebrauchtem Harz wurde untersucht; die Elution von gebundenen Aminen in der Säule und im "batch"-Verfahren wurde verglichen; die Empfindlichkeit der Methode wurde durch Aufgabe kleinster Mengen getestet. Anschließend wurden die Eichgeraden für die Substanzen erstellt, Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit der Methode wurden bestimmt. Im Anschluß an die Untersuchung angereicherter Urinproben wurden mehrere authentische Proben untersucht. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Ergebnisse mehrerer Proben von "Herzversagen" wurden den von "Tod durch Erhängen" gegenübergestellt.

Die Mittelwerte der zwei Reihen wurden vergleichenden Betrachtungen unterzogen. Die geringe Zahl der Untersuchungen läßt hierbei keine differenzierten Aussagen zu. Die Tendenz der Ergebnisse ist jedoch interessant, weil zum Teil erwartete Unterschiede bestätigt werden. Eine größere Zahl von Proben sollte hier genauere Ergebnisse bringen.

Wir konnten mittels der untersuchten Proben jedoch zeigen, daß die Methode praktikabel und zum Nachweis der gesuchten Amine geeignet ist. Die Analysezeit liegt mit ca. 2 1/2 Stunden in einem akzeptablen Bereich. Die vielmalige Wiederverwendbarkeit des Austauschharzes unter Einsatz eines Gaschromatographen machen die Methode wirtschaftlich interessant.

Zum Schluß folgt eine Zusammenstellung des von uns erarbeiteten Verfahrens zur Isolierung und quantitativen Bestimmung von A, NA, MN, DA, NMN, MOT und TYR aus postmortalem Urin:

1. Hydrolyse der Amine aus der Sulfat und Glukuronidbindung. Die Probe wurde mit 1 n HCl auf pH 1 gebracht und 20 Minuten im Alublock auf 100°C erhitzt.
2. Einstellen auf pH 3,5 mit NaHCO<sub>3</sub>,
3. Ionenaustauschchromatographie zur Abtrennung von sauren und neutralen Substanzen. Die Elution erfolgt durch eine Propionylierung der Amingruppen zu Amiden, wobei gleichzeitig eine Stabilisierung und eine Erhöhung der Lipidlöslichkeit erreicht wird.
4. Extraktion der gebildeten Propionylderivate mit Äthylacetat,
5. Nachderivatisierung der gereinigten Proben zur quantitativen Umsetzung der Hydroxylgruppen mit Propionylsäureanhydrid,
6. Einengung zur Trockene im Evaporator und Lösung in 100 µl Äthylacetat,
7. Gaschromatographische Bestimmung und quantitative Auswertung durch Vergleich mit einer Probe eines Reinsubstanzgemisches bekannter Konzentration.

Literaturverzeichnis

- ANDERSON, G. M.; JOUNG, J. G.; JATLOW, P. I. and COHEN, D. J.: Urinary free catecholamines determined by liquid Chromatography-Fluorometry.  
Clin. Chem. 27/12, SS. 2060 - 2063, (1981);
- ÄNGAARD, E.; SEDVALL, G.: Gaschromatography of catecholaminemetabolites using electronic capture detection and mass spectrometry.  
Analyt. Chem. 41, SS. 1250 - 1256, (1969);
- ASSICOT, M.; BOHUON, C.: Purification and studies of COMT of rat liver.  
Europ. J. Biochem. 12, SS. 490 - 501, (1970);
- ATACK, C. V.; MAGNUSSON, T.: Individual elution of noradrenaline (together with adrenaline), dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine from a single, strong cation exchange column, by means of mineralacid-organic solvent mixtures.  
J. Pharm. Pharmacol. 22, SS 625 - 627, (1970);
- AXELROD, J.: Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines.  
Pharmacol. Rev. 18, SS. 95- 113, (1966);
- AXELROD, J.; SENOH, S.; WITKOP, B.: O-methylation of catecholamines in vivo.  
J. Biol. Chem. 233, S. 697, (1958);
- AXELROD, J.; TOMCHIK, R.: Enzymetic O-methylation of epinephrine and other catechols.  
J. Biol. Chem. 233, SS. 702 - 705, (1958);

AXELROD, J.; VESELL, S. E.: Heterogeneity of N - and O-methyltransferases.

Mol. Pharmacol. 6, SS. 78 - 84, (1970);

AXELROD, J.; WAYNE, A.; CARMINE, O. C.: Distribution of catechol - O - methyltransferase in the nervous system and other tissues.

J. Neurochem. 5, SS. 68 - 72, (1959);

AXELROD, J.; WEIL - MALHERBE, H.; TOMCHICK, R.: The physiologic disposition of H<sup>3</sup>-epinephrine and its metabolite metanephrine.

J. Pharmacol. 127, S. 225, (1959);

BERG, S.: Das postmortale Verhalten des Blutes.

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 40, SS. 1 - 75, (1950);

BERG, S.: Adrenalin- und Noradrenalinwerte im Blut bei gewaltsamen Todesursachen.

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 57, SS. 179 - 183, (1966);

BERG, S.; BONTE, R.: Katecholaminwerte im Leichenblut und -liquor bei verschiedenen Agonieformen.

Z. Rechtsmed. 72, SS. 56 - 62, (1973);

BELFRAGE, E.; FREDHOLM, B. B.; ROSELL, S.: Effect of COMT inhibition on the vascular and metabolic responses to noradrenaline, isoprenaline and sympathetic nerve stimulation in canine subcutaneous adipose tissue.

Naunyn Schmiedebergs

Arch. Pharmacol. 300, SS. 11 - 17, (1977);

BLASCHKO, H.; RICHTER, D.; SCHLOSSMANN, H. J.: Inactivation of adrenaline.

J. Physiol. (Lond.) 90, SS. 1 - 17, (1937);

- BLASCHKO, H.; SAGERS, G.; SMITH, A. D.: Handbook of Physiology Vol. VI Endocrinology.  
American Physiological Soc. Washington D. C. (1975);
- BROOKS, D. J. W.; HORNING, E. C.: Gaschromatographic studies of catecholamines, tryptamines and other biological amines. Part I,  
Catecholamines and related compounds.  
Anal. Chem. 36, SS. 1540 - 1545, (1964);
- BROWN, G. L.; GILLESPIE, J. S.: Output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat.  
J. Physiol. (Lond.) 138, SS. 81 - 102. (1957);
- BOENISCH, H.; TRENDELENBURG, U.: Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart.  
Naunyn Schmiedeberg's  
Arch. Pharmacol. 283, SS. 223 - 244, (1974);
- BOENISCH, H.; UHLIG, W.; TRENDELENBURG, U.: Analysis of the compartments involved in the extraneuronal storage and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart.  
Naunyn Schmiedeberg's  
Arch. Pharmacol. 283, SS. 191 - 218;
- BOLSHAKOVA, T. D.: Certain aspects of catecholamine metabolism in man under stress  
Catecholamines and stress:  
Recent Advances; Elsevier North Holland (1980);
- BRONAUGH, R. L.; HATTOX, S. E.; HOEHN, M. M. et al.: The separation and identification of dopamine 3-O-sulfate and dopamine 4-O-sulfate in urine of parkinsonian patients.  
J. Pharmacol. Ther. 195, SS. 441 - 452, (1975);
- BURN, G. P.: Brit. Med. J. 28/3, S. 697, (1953)  
zitiert in KÄRKI (1956);

- BURTIS, C. A.; GOLDSTEIN, G.; SCOTT, C. D.: Fractionation of human urine by gelchromatography.  
Clin. Chem. 16/3, SS. 201 - 206, (1970);
- CHALMERS, T. M.; LEWIS, A. A. G.: Stimulation of the supraoptico - hypophysial system in man.  
Clin. Sci. 10, SS. 127 - 135, (1951);
- COLLINS, G. G. S.; SANDLER, M.: Human blood platelet monoamine oxydase; purification and characterization.  
Biochem. Pharmacol. 20, SS. 289 - 296, (1971);
- CORNE, S. J.; GRAHAM, J. D. P.: Effect of inhibition of monoamineoxidase in vivo on administrated adrenaline, tyramine and serotonin.  
J. Physiol. (Lond.) 135, SS. 339 - 349, (1957);
- CROUT, J. R.: Effect of inhibiting both Catechol-O-methyl transferase and monoamine oxidase on cardiovascular responses to norepinephrine.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 108, SS. 482 - 484, (1961);
- DETERMANN, H.: Gelchromatographie  
Berlin, Springer-Verlag 1967
- DONIKE, M.: N-methyl-n-trimethylsilyltrifluoracetamid ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide.  
J. Chromatogr. 42, SS. 103 - 104, (1969),  
zitiert in KAUERT;
- DRUJAN, O.: The differential determination of catecholamines in urine.  
Canad. J. Biochem. 37, SS. 1153 - 1159, (1959);

- EBNER, F.: A second stereospecific effect of propanolol on the isometric contraction of ventricular myocardium in the presence of catecholamines  
Naunyn Schmiedebergs  
Arch. Pharmacol. 302, R 31, (1978);
- ELMADIJAN, F.; HOPE, J. M.; LAMSON, E. T.: Excretion of epinephrine and norepinephrine under stress.  
Recent Progr. Hormone Res. 14, S. 513, (1958);
- ENOS, W. F. J.; BEYER, J. C.; HOLMES, R. H.: Pathogenesis of coronary disease in american soldiers killed in Korea.  
J. Amer. med. Ass. 158, SS. 912 - 914, (1955);
- EULER, U. S. von; Adrenaline and noradrenaline; distribution and action.  
Pharmacol. Rev. 6, S. 15 - 21, (1954);
- EULER, U. S. von; GENZELL, C. A.; STROM, G.; WESTMANN, A.: Adrenaline and noradrenaline levels in various diseases.  
Acta. med. scand. 153, SS. 127 - 134, (1955);
- EULER, U. S. von; HELLNER, J.: Excretion of noradrenaline, adrenaline and hydroxytyramine in urine.  
Acta. physiol. scand. 22, SS. 161 - 167, (1951);
- EULER, U. S. von; LISHAJKO, F.: The estimation of catecholamines in urine.  
Acta physiol. scand. 45, S. 122, (1959);
- EULER, U. S. von; LUFT, R.: Metabolism 1, S. 179, (1952), zitiert in KÄRKI
- FLODIN, P.; PORATH, J.: Molecular sieve process.  
in Heftmann (Ed.): Chromatography, 328 New York 1961

- FLOOD, J. G.; Mc COMB, R. B.: Urinary metanephrines as measured by liquid chromatography with an on-line post-column reaction detector.  
Clin. Chem. 27/7, SS. 1268 - 1271, (1981);
- FRERE, J. M.; VERLY, W. G.: Catechol-O-Methyl-Transferase. The para- and meta-O-methylation of nor-adrenaline.  
Biochem. Biophys. Acta 235, SS. 73 - 84, (1971);
- FRIEND, G.; ZIBELI, M. S.; HAMILIN, J. R.; REUTTER, F. W.: Effect of iproniazid on the inactivation of norepinephrine in the human.  
J. clin. exp. Psychotherap. 19, SS. 61 - 68, (1958);
- FURCHTGOTT, R. F.; WEINSTEIN, P.; HUEBL, H.; BOZORGMEHRI, P.: Mensendiek, S. R.: Effect of inhibition of monoamine-oxidase on response of rabbit aortic strips to sympathomimetic amines.  
Fed. Proc. 14, SS. 341 - 342, (1955);
- GILLESPIE, J. S.; MUIR, T. C.: Species and tissue variation in extraneural and neuronal accumulation of nor-adrenaline.  
J. Physiol. (Lond.) 206, SS. 591 - 604, (1970);
- GLNN, R.; VANE, R.: Disappearance of catecholamines from the circulation.  
Nature 219, SS. 740 - 742, (1968);
- GRAEFE, K. H.; TRENDELENBURG, U.: The effect of hydrocortisone on the sensitivity of the isolated membrane to catecholamines. Relationship to extraneuronal up take and metabolism.  
Naunyn Schmiedeberg's  
Arch. Pharmacol. 271, SS. 1 - 28, (1974);

- GREER, M.; SPRINKLE, T. J.; WILLIAMS, C. M.: Determination of urinary 3-methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine in pheochromocytoma and neuroblastoma by gas-chromatography.  
Clin. Chim. Acta 21, SS. 247 - 253, (1968);
- GOLDSTEIN, M.; FRIEDHOFF, A. J.; SIMMONS, C.: A method for the separation and estimation of catecholamines in urine.  
Experientia (Basel) 15, SS. 80 - 81, (1959);
- GOODALL, MC. C.; ALTON, H.: Urinary excretion of adrenaline metabolites in man during intervalls of 2 -, 5 -, and 10 minutes after intravenous injection of adrenaline.  
Biochem. Pharmacol. 14, SS. 1505 - 1604, (1965);
- GRIESSMER, E. C.; BARSKY, C. A.; WELLS, J. A.; ZELLER, E. A.:  
Proc. soc. exp. Biol. (N. Y.) 98, S. 74,  
zitiert in AXELROD, J.;
- HEMPEL, K.; KAYER, F. E.; RÖGER, N.; HENNEMAN, H.;  
HEIDLAND, A.: Abbau von Katecholaminen während der renalen Exkretion.  
In: Renale Elimination von Pharmaka S. 107,  
hrsg. von HEINTZ, R.; HOLZHÜTTER, H. Aachen 1972;
- HENSELING, M.; RECHTSTEINER, D.; TRENDELENBURG, U.: The influence of monamineoxidase and COMT activity in human red blood cells.  
Naunyn Schmiedebergs  
Arch. Pharmacol. 297, R. 48, (1978);
- HIEMKE, Ch.: Untersuchungen zur Isolierung und gaschromatographischen Bestimmung von Katecholaminen, Serotonin und deren basischen Metaboliten.  
Inaugural-Dissertation Bonn (1977);

- HIGA, S.; SUZUKI, T.; HAYASHI, A. et al.: Isolation of catecholamines in biological fluids by boric acid gel. Anal. Biochem. 77, SS. 18 - 24, (1977);
- HILL, E.: Significance of dextrose and nondextrose reducing substances in post mortem blood. Arch. Pathol, 32, S. 452, (1941), zitiert in LAVES, W.;
- HIRVONEN, J.; HUTTUNEN, D. M. S.; HUTTUNEN, P.: Increased urinary concentration of catecholamines in hypothermia deaths. J. of Forensic Sci. 27/2, SS. 264 - 271, (1982);
- HOHLBAUM, K.: Der Adrenalin - Noradrenalin - Quotient im Leichenblut bei forensisch wichtigen Todesursachen. Diss. Med. Universität Göttingen 1968;
- HORNING, M. G.; MOSS, A. M.; HORNING, E. C.: A new method for the separation of the catecholamines by gas liquid chromatography. Biochem. Biophys. Acta 148, SS. 597 - 600, (1967);
- IMAI, K.; TAMURA, Z.: Liquid chromatographic determination of urinary dopamine and norepinephrine as fluorescentamine derivatives. Clin. Chim. Acta 85, SS. 1 - 6, (1978);
- IVERSEN, L. L.: The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart. A novel catecholamine uptake process. Br. J. Pharmacol. 25, SS. 18 - 33, (1965);
- IVERSEN, L. L.; GLOWINSKY, J.; AXELROD, J.: The physiological disposition and metabolism of norepinephrine in immunosympathectomized animals. J. Pharmacol. 151, SS. 273 - 284, (1966);

- IVERSEN, L. L.; SALT, P. J.: Hinhibition of catecholamin uptake by steroids in the isolated rat heart.  
Br. J. Pharmacol. 40, SS. 528 - 530, (1970);
- IVERSEN, L. L.; SALT, P. J.; WILSON, H. A.: Inhibition of catecholamine uptake in the isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine.  
Br. J. Pharmacol. 46, SS. 647 - 657, (1972);
- JANSON, C. D.: Adsorption phenomena on Sephadex.  
J. Chromatogr. 28, S. 12, (1967);
- JARROT, B.; IVERSEN, L. L.: Noradrenaline metabolizing enzymes in normal and sympathetically denervated vas deferens.  
J. Neurochem. 18, SS. 1 - 6, (1971);
- JONES, M. T.; BRIDGES, P. K.; LEAK, D.: Relationship between the cardiovascular response to the psychological stress of an examination.  
Clin. Sci. 35, SS. 73 - 79, (1968);
- KÄRKI, N. T.: The urinary excretion of noradrenaline and adrenaline.  
Acta physiol. scand. Suppl. 133, Turku 1956;
- KATZ, B.; MILEDI, R.: A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses.  
J. Physiol. (Lond.) 189, SS. 535 - 544, (1967);
- KAUERT, G.: Isolierung und gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung biogener Amine des Katechol- und Indolalkylstoffwechsels aus Urin.  
Inaugural-Dissertation Bonn 1977;

- KISSINGER, P. T.; RIGGIN, R. M.; ALCORN, R. L.; RAU, L. D.:  
Estimation of catecholamines in urine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection.  
Biochem. Med. 13, SS. 299 - 306, (1975);
- KNOLL, J.; MAGYAR, K.: Some puzzling pharmacological effects of monoamineoxidase inhibitors.  
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 5, SS. 393 - 408, (1972);
- KONZETT, H.; HÖRTNAGEL, H.; WINKLER, H.: On the urinary output of vasopressin, epinephrine and norepinephrine during different stress situations.  
Psychopharmacol. (Berl.) 21, SS. 247 - 256, (1971);
- KOPIN, I. J.; AXELROD, J.; GORDON, E. K.: The metabolic fate of  $H^3$ -epinephrine and  $C^{14}$ -metanephrine in the rat.  
J. Biol. Chem. 236, SS. 2109 - 2113, (1961);
- KOPIN, I. J.; GORDON, E. K.: Metabolism of administered and drug released norepinephrine-  $7 H^3$  in the rat.  
J. Pharmacol. 138, SS. 351 - 357, (1962);
- KUEHL, F. A.: Para-O-Methylation of dopamine in schizophrenic and normal individuals.  
In: HINWICH, H. E.; KETY, S. S.; SMYTHIES, J. R.: Amines and schizophrenia.  
Pergamon Press Oxford 1967  
zitiert in KAUERT, G. (49);
- KVETNANSKY, R.; MIKULAJ, L.: Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaption to repeated immobilization stress.  
Endocrinology 89, S. 46, (1971);

- LA BROSSE, E. A.; AXELROD, J.; KETY, S. S.: O-Methylation, the principal route of metabolism of epinephrine in man. Science 128, SS. 593 - 594, (1958);
- LAM, R. W.; ARTAL, R.; FISHER, D. A.: Radioimmunoassay for free and conjugated urinary metanephrine. Clin. Chem. 23, SS. 1264 - 1267, (1977);
- LANGER, S. Z.: The metabolism of  $H^3$ -noradrenaline released by electrical stimulation from the isolated nictitating membrane of the cat and from the vas deferens of the rat. J. Physiol. (Lond.) 208, SS. 515 - 546, (1970);
- LAVES, W.; BERG, S.: Agonie; Physiologisch-chemische Untersuchungen bei gewaltsamen Todesarten. Max Schmidt-Römhild, Lübeck 1965;
- LUFT, R.; EULER, U. S. von J. clin. Invest. 32, S. 1065, (1953) zitiert in KÄRKI, N. T. (47);
- LUKOMSKY, P. G.; OGANOW, R. G.: Bloodplasma catecholamines and their urinary excretion in patients with acute myocardial infarction. Amer. Heart J. 83, SS. 182 - 188, (1972);
- LUND, A.: Adrenaline and noradrenaline in post-mortem blood. Med. Sci. Law 4, SS. 194 - 199, (1964);
- MAAS, J. W.; LANDES, D. H.: The metabolism of circulating norepinephrine by human subjects. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 174, SS. 369 - 378, (1976);

MÄURER, W.; YOSHIDA, Y.; KÜBLER, W.: Die Urinausscheidung der Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin sowie der Abbauprodukte Metanephrin und Normetanephrin bei Herzkranken.

Z. Kardiologie. 65, SS. 1124 - 1138, (1976);

MATLINA, E. S. H.: Main phases of catecholamine metabolism under stress.

In: USDIN, E.; KVETNANSKY, R.; KOPIN, I. J.:

Catecholamines and stress

Pergamon press (Oxford), SS. 353 - 365, (1976);

MELL, L. D.; GUSTAFSON, A. B.: Urinary free norepinephrine and dopamine determined by reversed-phase high-pressure liquid chromatography.

Clin. Chem. 23, SS. 473 - 476, (1977);

MENSHIKOV, V.; BOLSHAKOVA, T.; BEREZIN, F.: The effect of climatic and geographical conditions of the north-east of the USSR.

Aus: USDIN, E.: Catecholamines and stress

Recent Advances;

MOYER, T. P.; JIANG, N.; TYCE, G. M.; SHEPS, S.G.: Analysis for urinary catecholamines by Liquid Chromatography with emperometric detection: Methodology and clinical interpretation of results.

Clin. Chem. 25/2, SS. 256 - 263, (1979);

MUELLER, B.: Gerichtliche Medizin I

Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1975);

MUSCHOLL, E.: Catecholamines

Ed. H. BLASCHKO: Handbuch der experimentellen Pharmakologie

Springer Berlin 1972;

- MUSKIET, ; FRITSA, J.; THOMASSON, C. G.; GERDING, A. M.;  
FREMOUW-OTTEVANGERS, D. C.; NAGEL, G. T.; WOLTERS, B. G.:  
Clin. Chem. 25,3, SS. 453 - 460, (1979);
- NAGATSU, T.; LEVITT, M.; UDENFRIED, S.: Tyrosinhydroxy-  
lase the initial step in norepinephrine biosyntheses.  
J. Biol. Chem. 239, S. 2910, (1964);
- NELSON, L. M.; BUBB, F. A.; LAX, P. M. etal: An improved  
method for the differential assay of 3-O-methylated  
catecholamines in human urine using ion-pair extraction  
and gas chromatography electron capture detection.  
Clin. Chim. Acta 92, SS. 235 - 240, (1979);
- O'CONNOR, W. J.; VERNEY, E. B.: The effect of the removal  
of the posterior lobe of the pituitary on the inhibi-  
tion of water diureses by emotional stress.  
Quart. J. exp. Physiol. 31, SS. 393 - 408, (1942);
- OKA, K.; SEKIYA, M.; OSADA, H.; FUGITA, K.; KATO, T.;  
NAGATSU, T.: Simultaneous Fluorometry of Urinary Dopa-  
mine, Norepinephrine and Epinephrine Compared with  
Liquid Chromatography with Electrochemical Detection.  
Clin. Chem. 28/4, SS. 646 - 649, (1982);
- PAIVA, M. Q.; GUIMARIES, S.: A comparative study of the  
uptake and metabolism of NA and A by the isolated  
saphenous vein of the dof.  
Naunyn Schmiedebergs  
Arch. Pharmacol. 303, SS. 221 - 228, (1978);
- PARVEZ, H.; PARVEZ, S.: Activity of COMT- and MAO enzymes  
in different body organs of the rat following metopi-  
rone administration.  
Pharmacol. Res. Comm. 4, S. 369, (1972);

- PERRY, T. L.; SCHROEDER, W. A.: The occurrence of amines in human urine. Determination by combined ion exchange and paper chromatography.  
J. Chromatogr. 12, SS. 358 - 373, (1963);
- PISANO, J. J.: A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine.  
Clin. Chim. Acta 7, SS. 285 - 291, (1961);
- QUEBBERMANN, B.; RENNICK, H.: Inhibition of the renal tubular transport of catecholamines by cocaine: An organic base mechanism.  
J. Pharmacol. exp. Ther. 175, S. 248, (1970);
- RAAB, W.; GIGEE, W.:  
Circulation 9, S. 592, (1954)  
zitiert in KÄRKI, N. T. (47);
- RICHTER, D.: The inactivation of adrenaline in vivo in man.  
J. physiol. (Lond.) 98, S. 361, (1940);
- RIGGIN, R. M.; KISSINGER, P. T.: Determination of Catecholamines in urine by reverse-phase liquid chromatography with electrochemical detection.  
Anal. Chem. 49, SS. 2109 - 2111, (1977);
- SALEH, N.; KVETNANSKY, R.: The inhibitory effects of glucocorticoids on the activity of catecholamine degrading enzymes in the rat liver.  
Physiol. bohemoslav. 24, S. 82, (1975);
- SCOTT, C. D.: Analysis of urine for its ultraviolet absorbing constituents by high pressure anion exchange chromatography.  
Clin. Chem 14, S. 521, (1968);

- TIPTON, C. M.; STRUCK, P. J.; BALDWIN, K. M.; MATTHES, R. D.;  
DOWELL, R. T.: Response of adrenalectomized rats to  
chronic stress.  
Endocrinology 91, S. 573, (1972);
- TRENDELENBURG, U.: Supersensitivity and subsensitivity  
to sympathomimetic amines.  
Pharmacol. Rev. 15, SS. 225 - 276, (1963);
- TRENDELENBURG, U.: A Kinetic Analysis of the Extraneural  
Uptake and Metabolism of Catecholamins.  
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. Vol. 87,  
Spirngs Verlag 1980;
- USDIN, E.; KVETNANSKY, R.; KOPIN, I. J.: Catecholamines  
and stress.  
Pergamon Press (Oxford), 1976;
- USDIN, E.; SNYDER, S.: Frontiers in catecholamine research.  
Pergamon Press, Oxford - New York, 1973;
- VAN DE CALSEYDE, J. F.; SCHOLTIS, R. J. H.; SCHMIDT, N. A.;  
LEYTON, C. J. J. A.: Gas chromatography in the estima-  
tion of urinary metanephrines and VMA.  
Clin. Chim. Acta 32, SS. 361 - 366, (1971);
- VENDSALU, A.: Studies on adrenaline and noradrenaline in  
human plasma.  
Acta phys. Scand. 49, Suppl. 173, (1960);
- VERITY, M. A.: Morphologic studies of vascular neuro-  
effector apparatus.  
In: BEVAN, J. A.; FURCHGOTT, R. F. et al;  
Proc. Symp. Physiol. Pharmacol. Vasc.;  
Neuroeffecotr Systems Interlaken 1969  
Karger Basel SS. 2 - 12;

- VIGAS, M.: Contrivution to the understanding of the stress concept.  
In: USDIN/KVETNANSKY/ KOPIN: Catecholamines and stress. Recent Advances, North Holland 1980;
- WEIL-MALHERBE, H.: The estimation of total (free and conjugated) catecholamine metabolites in human urine.  
Meth. Biochem. Anal. 16, SS. 293 - 326, (1967);
- WALDEYER, A.: Anatomie des Menschen.  
Walter de Gruyter Berlin 1976;
- WERNING, C.; SIEGENTHALER, W.: Krankheiten des Nebennierenmarks.  
Aus: HORNBOSTEL, H.: Innere Medizin in Praxis und Klinik, Bd. I, S. 4.113, (1976);
- WESTERINK, B. H. C.; BOSKER, F. J.; O'HANLON, J. F.:  
Use of Alumina, Sephadex G 10 and Ion-Exchange Columns to Purify Smples for Determination of E, NE, DA, HVA, 5H/AA in Urine.  
Clin. Chem. 28/8, SS. 1745 - 1748, (1982);
- WHITBY, G.; AXELROD, J.; WEIL-MALHERBE, H.: The fate of 7-H<sup>3</sup>-norepinephrine in animals.  
J. Pharmacol. 127, S. 225, (1959);
- WISSER, H.; KNOLL, E.: Die Analytik der Katecholamine und einiger Abbauprodukte im Urin und Plasma.  
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1, SS. 3 - 14, (1973);
- WROBLESKY, R.; MARKIEWICZ, L.: Excretion of catecholamines in urine under conditions of emotional stress (shocking movies).  
Int. Z. angew. Physiol. 31, SS. 327 - 331, (1973);

WONG, K. P.; RUTHVEN, C. R. J.; SANDLER, M.: Gaschromatographic measurement of urinary catecholamines by an electron capture detection procedure.

Clin. Chim. Acta 47, SS. 215 - 222, (1973);

WURTMANN, R. J.: In catecholamines.

Little Brown Boston 1966;

WURTMANN, R. J.; AXELROD, J.: Control of enzymatic syntheses of adrenaline in the medulla by cortical steroids.

J. Biol. Chem. 241, S. 2301, (1966);

YAMAKAMI, A.: Osmotischer Druck des Blutserums bei Erstickungen.

Tokoku J. exper. Med. 4, S. 88, (1923)

zitiert in LAVES, W. (58);

TIGRANIAN, R. A.; KVETNANSKY, R.; KALITA, N. F.;

DAVIDOVA, N. A.; PAVLOVA, E. A.: Effect of Space flight factors on the activity of the sympathetic adrenomedullary and the pituitary-adrenocortical systems.

Catecholamines and stress:

Recent Advances; Elsevier North Holland (1980);

KVETNANSKY, R.; SUN, C.:

Endocrinology, 103, SS. 1868 - 1874, (1978);

Ganz herzlich danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. W. Spann, der es mir ermöglichte,  
diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen  
und

Herrn Privatdozent Dr. G. Kauert für die jederzeit sehr  
freundliche Beratung und seine vielen wertvollen  
Anregungen.







## Lebenslauf

Am 19. Juni 1954 wurde ich als dritter Sohn des Steinmetzes Johann Mößner und seiner Ehefrau Apollonia geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich in Hauzenberg die Volksschule, anschließend den mathematischen Zweig des Gymnasiums Waldkirchen. Dort legte ich im Juni 1974 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München, wo ich im Wintersemester 1979/80 das Staatsexamen absolvierte.

Seit 1981 arbeite ich als Assistent in einer Praxis in Passau.

